

HOVEDFAGSOPPGAVE FOR GRADEN
Candidata pharmaciae

**Identifisering av mulige interaksjoner mellom
NGFI-B og proteiner i BCL-2-familien**



Björg-Marie Grjøtheim
2007

**Avdelingen for Farmasøytisk Biovitenskap
Farmasøytisk Institutt
Det Matematisk- og Naturvitenskapelig Fakultet
Universitet i Oslo**

Forord

Dette hovedfagsarbeidet ble utført ved Avdelingen for Farmasøytisk Biovitenskap ved Universitetet i Oslo, i tidsrommet november 2006 til november 2007. Arbeidet ble gjort som en del av graden *Candidata pharmaciae*.

Jeg vil gjerne takke min veileder Prof. Ragnhild Paulsen for et faglig inspirerende år og for god hjelp og rettledning gjennom utformingen av oppgaven. Du er alltid positiv og svarer gjerne på spørsmål.

Jeg vil også takke min ko-veileder Bjørn Oddvar Strøm for all hjelp i labarbeidet og i skriveprosessen. Du har en smittende entusiasme og stiller alltid opp.

En stor takk til Mona Gaarder for alle tips i labarbeidet og ditt alltid gode humør.

Sammen med de andre på forskningsgruppen har dere gjort dette året til et lærerrikt og hyggelig år.

Takk til mine medstudenter på avdelingen for et koselig og sosialt år og for et godt samarbeid til tross for ulike oppgaver.

Tilslutt vil jeg takke kjæresten min og min familie for all deres tålmodighet, støtte og oppmuntring gjennom alle studieårene.

Oslo, november 2007
Björg-Marie Grjotheim

Sammendrag

Apoptose (programmert celledød) er en mekanisme som har betydning i mange ulike typer sykdommer, f.eks. nevrodegenerative sykdommer og kreft. NGFI-B (nerve growth factor-inducible clone B) er en kjernereseptor som er involvert både i celleoverlevelse og celledød. Når NGFI-B er lokalisert i kjernen fungerer den som en transkripsjonsfaktor som fremmer proliferasjon og overlevelse. Ved ulike signaler kan NGFI-B translokere til mitokondriene og indusere apoptose. Dette kan skje ved at NGFI-B interagerer med et antiapoptotisk protein kalt BCL-2 (B-cell lymphoma protein 2), og omdanner BCL-2 fra å beskytte til å indusere apoptose av cellen. BCL-2 tilhører en gruppe antiapoptotiske proteiner, som sammen med en proapoptotisk proteingruppe utgjør BCL-2-familien. Det er den relative konsentrasjonen av antiapoptotiske og proapoptotiske BCL-2 proteiner som avgjør om cellen går inn i apoptose.

I denne oppgaven ble det undersøkt om to andre BCL-2 proteiner, de proapoptotiske proteinene BAX og BAD, interagerer med NGFI-B. Dette ble gjort ved å overuttrykke proteinene i CV-1 celler og analysere dem ved bruk av en luciferasemetode, hvor transkripsjonen av luciferase var NGFI-B avhengig. Ulike konsentrasjoner av BAX og BAD ble i separate forsøk brukt for å se om dette ga tilsvarende reduksjon i luciferaseverdiene. BAX og BAD så ut til å gi en doseavhengig reduksjon i luciferaseverdiene noe som kan indikere at det foreligger en interaksjon mellom BAX/BAD og NGFI-B i cytosol.

Luciferasemetoden ble også brukt til å se på hvordan inaktivering av fosforyleringssetene threonin-142, serin-139 og threonin-350 på NGFI-B, påvirket interaksjonen mellom NGFI-B og BCL-2. Dette ble også studert i CV-1 celler. NGFI-B Thr-142 mutanten så ut til å gi en sterkere interaksjon med BCL-2 enn NGFI-B-wt. NGFI-B Ser-139 mutanten så ikke ut til å påvirke interaksjonen med BCL-2 og Thr-350 NGFI-B mutanten så ut til å gi en svakere/ingen interaksjon med BCL-2 sammenlignet med NGFI-B-wt.

Konklusjonen er at NGFI-B synes å interagere med medlemmer av BCL-2-familien, og at denne interaksjonen kan være avhengig av NGFI-Bs fosforyleringsstatus.

Innhold

Forord	1
Sammendrag.....	2
Innhold	3
Forkortelser	5
1 Innledning.....	7
1.1 Apoptose og sykdommer	7
1.2 Generelle mekanismer for apoptose.....	7
1.3 Nerve Growth Factor-Inducible Clone B (NGFI-B).....	9
1.4 BCL-2 protein familien.....	12
1.4.1 Anti-apoptotiske BCL-2 proteiner	13
1.4.2 Pro-apoptotiske multidomene BCL-2 proteiner.....	16
1.4.3 Proapoptotiske BH3-only BCL-2 proteiner	17
1.5 BCL-2-familiens rolle ved mitokondriell (intrinsic) apoptose	20
1.6 Mål for oppgaven.....	23
2 Materialer og metoder	24
2.1 Kjemikalier og biologiske produkter	24
2.2 CV-1 celler.....	26
2.2.1 Splitting av CV-1 celler	26
2.2.2 Transfeksjon av CV-1 celler med CaCl ₂	27
2.3 Mikroskopering.....	29
2.3.1 Farging	30
2.4 Luciferase.....	31
2.4.1 Høsting av celler til måling av ildflue- og renilla-luciferase	32
2.4.2 Måling av luciferase.....	33
2.5 Westernblotting.....	34
2.5.1 Høsting av celler til Westernblotting	35
2.5.2 Metode for Westernblotting.....	36
2.6 Ko-immunpresipitering.....	42
2.6.1 Høsting av celler til ko-immunpresipitering	42
2.6.2 Utførelse av ko-immunpresipitering	42
2.7 Statistikk	44

3	Resultater	45
3.1	Mikroskopering.....	45
3.1.1	Lokalisering av NGFI-B når ko-transfektet med BCL-2-familien.....	45
3.1.2	Lokalisering av BIM i cellen	47
3.1.3	Celledød	49
3.2	Kontroller for luciferasemålinger	51
3.2.1	Renillaluciferase (RL).....	51
3.2.2	RSV-luciferase	52
3.3	Luciferase-resultater	54
3.3.1	Luciferasemålinger med en fast konsentrasjon for BCL-2 plasmidene	54
3.3.2	Luciferasemålinger med graderte konsentrasjoner av BCL-2 plasmidene ..	55
3.4	Graderte konsentrasjoner av BCL-2 plasmidet og mutanter av NGFI-B	58
3.5	Ko-immunpresipitering.....	60
3.5.1	Westernblotting.....	61
3.5.2	Metodeoptimalisering av ko-immunpresipitering.....	62
4	Diskusjon	65
4.1	Diskusjon av metoder	65
4.1.1	CV-1 celler.....	65
4.1.2	Mikroskopering.....	65
4.1.3	Luciferasemetoden.....	66
4.1.4	Ko-immunpresipitering.....	69
4.2	Diskusjon av resultater.....	71
4.2.1	BIM _{EL}	71
4.2.2	BCL-2	72
4.2.3	BAX	73
4.2.4	BCL-X _L	74
4.2.5	BAD	75
4.2.6	NGFI-B mutanter	76
5	Konklusjon	79
6	Referanser	80

Forkortelser

Forkortelse

Ad
AIF
Apaf-1
APS
BAD
BAK
BAX
BBS
BCL-2
BCL-B
BCL-X_L
BES
BFL-1
BH
BIM
BSA
CICD
DBD
DIVA
DMEM
DR
DTT
EDTA
EGF
ER
ERK
FADD
FDA
FL
GFP
HEPES
JNK
LBD
MCL-1
MOMP
MQ
MTD
NBRE
NES
NGF
NGFI-B
NLS
NurRE
PBS
PI

Forklaring

Opp til
Apoptose induserende faktor
Apoptose proteaseaktiverende faktor 1
Ammonium persulfat
BCL-2 assosiert dødspromotor homolog
BCL-2 homolog antagonist morderprotein
BCL-2 assosiert protein X
BES bufret saltvann
B-celle lymfoma protein 2
BCL-2-familie protein lignende Boo
BCL-2 assosiert X protein Large
N,N-Bis-(2-hydroxyetyl)-2-aminoetansulfonsyre
“BCL-2 related gene expressed in fetal liver”
BCL-2 homologe domener
BCL-2 interagerende celledøds mediator
Bovin serum albumin
Caspaseuavhengig celledød
DNA-bindingsdomene
Dødsinduser som binder til BCL-2 og Apaf-1
Dulbecco's modified eagle medium
Direkte repitisjoner
Dithiothreitol
Etylendiamintetraeddiksyre
Epidermal vekstfaktor
Endoplasmatisk retikulum
Ekstracellulær signalregulert kinase
Fas-assosiert dødsdomene
Fluorecein diacetat
Ildflueluciferase (Firefly luciferase)
Grønt fluorescerende protein
4-(-2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonsyre
Jun-N-terminal kinase
Ligand bindingsdomene
Myeloid leukemia cellelinje-1
Mitokondriell yttermembran permeabilisering
Milli-Q
Matador
NGFI-B respons element
Kjerne eksportsignal
Nervevekst faktor
Nervevekstfaktor indusert klon B
Kjerne lokaliseringssignal
Nur respons element
Fosfatbufret saltvann
Propidium iodid

PMSF	Pentametansulfonylfluorid
PTP	"Permeability transition pore"
RL	Renilla luciferase
RLU	Relativ luciferase enhet
RSK	p90 ribosomal S6 kinase
SDS	Natrium dodecylsulfat
BID	BH3 interagerende domene dødsagonist protein
TBS	Tris bufret saltvann
TM	Transmembrant domene
Tris	Trishydroxymetylaminometan
VDAC	Spenningsavhengige anionkanal
wt	villtype

1 Innledning

1.1 Apoptose og sykdommer

Apoptose er en viktig mekanisme i vitale prosesser inkludert normal celledødsprosess, riktig utvikling og funksjonalitet av immunsystemet, fosterutvikling og kjemisk induisert celledød. Forstyrrelser i apoptosemekanismen (for mye eller for lite) er en faktor som spiller inn i mange ulike sykdommer inkludert nevrodegenerative sykdommer, ischemisk skade, autoimmune sykdommer og mange typer kreft. Det ligger her et stort terapeutisk potensiale og det er derfor viktig at forskningen forsetter å avdekke alle trinn som er involvert i apoptose (Elmore 2007).

1.2 Generelle mekanismer for apoptose

Celledød kan opptre på to hovedmåter: nekrose og apoptose. Nekrose er en passiv, katabolsk, patologisk celledødsprosess, som generelt skjer som en respons til eksterne toksiske faktorer (f.eks inflammasjon, ischemi eller toksisk skade). Nekrose karakteriseres ved svelling av mitokondriene, tidlig skade på plasmamembranen, dispersert kromatin og rask ødeleggelse av de intakte strukturene i cellen.

Apoptose ble første gang beskrevet i 1972 (Kerr et al. 1972).

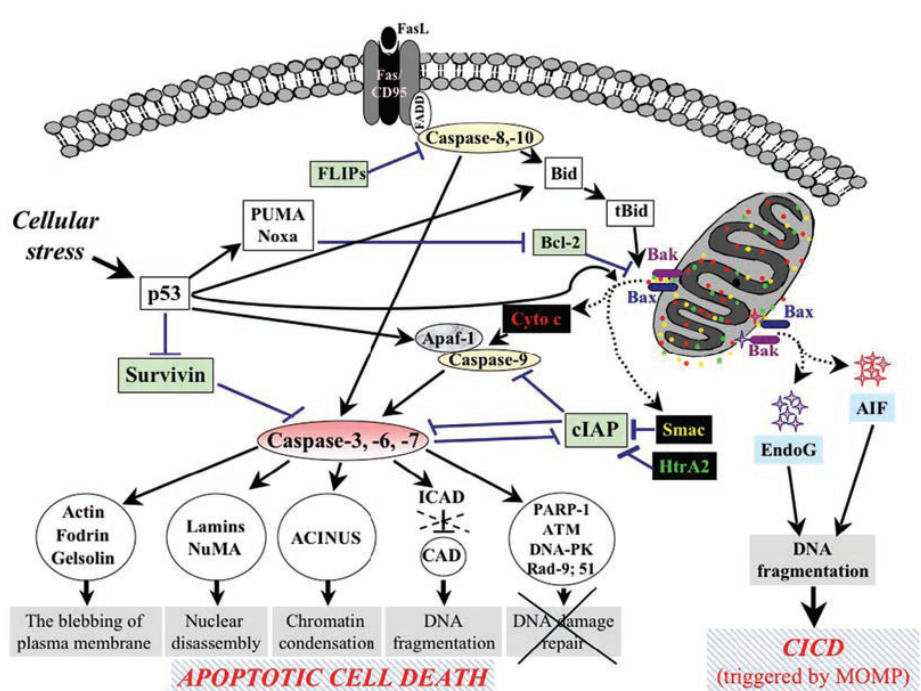
Det er en aktiv metabolsk, genetisk kodet og evolusjonær vei. Den skjer ved både fysiologiske og patologiske tilstander. Apoptose karakteriseres av membran "blebbing", kromatin kondensering og aktivering av endonukleolytiske prosesser som fører til kløyving av kromosomalt DNA. Som et resultat vil cellen krympe og kondensere til små membranbundne apoptotiske legemer som fagocyteres av makrofager. På denne måten hindres det at celleinnholdet lekker ut til omliggende celler og gir inflammatoriske tilstander i vevet rundt (Wu et al. 2001).

Apoptose kan deles inn i to hovedmekanismer, intrinsic og extrinsic vei (Figur 1.1).

Extrinsic signalvei involverer binding av ekstracellulære ligander (f.eks FasL) til reseptorer på celleoverflaten (f.eks Fas/CD95). Dette gir rekruttering av cytosoliske adaptor proteiner [f.eks "Fas-associated death domain"(FADD)], aktivering av

initieringscaspase (f.eks caspase 8) og påfølgende aktivering av nedstrøms effektor caspaser (caspase -3,-6 og -7). Det siste kan også oppnås via extrinsic vei gjennom induksjon av "mitochondrial outer membrane permeabilization" (MOMP), med påfølgende dannelse av et apoptosom (et kompleks mellom cytokrom c/Apaf-1/procaspase-9). MOMP er ikke nødvendig for extrinsic apoptotisk vei, men det forsterker signalet som cellen mottar fra dødsreseptoren.

Intrinsic (mitokondriell) vei (se også 1.5) integrerer signaler fra ulike stressfaktorer som virker på mitokondriene, f.eks DNA skade, skade på cytoskjelettet, stress som påvirker ER, mangel på vekstfaktorer og hemming av makromolekylær syntese. Denne typen apoptotisk stimulus gir en aktivering av MOMP, mulig ved dannelsen av membrangjennomtrengende porer slik at proteiner fra det intermembrane rommet frigjøres ut i cytosol. Cytokrom c, en komponent i elektrontransportkjeden, fungerer som ko-faktor for Apaf-1 som utløser dannelsen av apoptosomet og videre aktiverer initierings- og effektor-caspase, henholdsvis caspase-9 og -3 (Blank and Shiloh 2007).



Figur 1.1 Skjematisk presentasjon av mekanismer som styrer extrinsic og intrinsic apoptoseveier og caspaseuavhengig celledød (CICD). Se tekst for detaljer.

Figuren er hentet fra Blank and Shiloh, 2007.

1.3 Nerve Growth Factor-Inducible Clone B (NGFI-B)

”Nerve growth factor-inducible clone B” (NGFI-B) er et 61 kDa stort protein som ble funnet å være en transkripsjonsfaktor induisert av nerve growth factor (NGF) i rotte. Det har stor homologi med medlemmer av glukokortikoidreseptor-gen familien (Milbrandt 1988). Senere fant man det samme proteinet i mus, kalt Nur77 (Hazel et al. 1988) og i menneske, kalt TR3 (Chang et al. 1989). NGFI-B utgjør sammen med Nurr1 (også kjent som RNR-1 eller NOT) og NOR-1 (også kalt MINOR) reseptor subfamilien NR4A1-3 som igjen er en del av steroidhormon kjernerreseptor superfamilien (Enmark and Gustafsson 1996; Forman et al. 1995; Mangelsdorf et al. 1995). Reseptorene i subfamilien har ingen kjent ligand og blir derfor kalt ”orphan”, og de har heller ikke noe klassisk ligandbindende sete (Wang et al. 2003). Dette indikerer at NR4A subfamilien reguleres på en liganduavhengig måte.

Strukturen til NGFI-B (Figur 1.2) består av et aktiveringssete ved N-terminalen kalt AF-1, et DNA-bindingsdomene (DBD) og et ligand-bindingsdomene (LBD) ved C-terminalen (Wilson et al. 1991). DBD inneholder et kjernelokaliseringssignal (NLS) og alle de 3 medlemmene i subfamilien NR4A vil derfor kunne lokaliseres til kjernen (Katagiri et al. 2000). Hos NGFI-B finner man tre kjerneeksportsignaler (NES) i LBD området i tillegg til et BCL-2 bindings domene (BCL-2 proteinene er beskrevet i 1.4) (Katagiri et al. 2000; Lin et al. 2004). LBD hos NGFI-B binder seg til DNA-sekvensen AAAGGTCA (NBRE, NGFI-B respons element) som monomer og til en omvendt repetisjon av en NBRE lignende sekvens (NuRE, Nur respons element) ved homodimerisering. Bindingssettet ved hetrodimerisering med andre kjernereseptorer, består av flere repetisjoner av NBRE-sekvensen (DR, direkte repetisjoner) adskilt av 1-5 nukleotider (Maira et al. 1999; Perlmann and Jansson 1995; Zetterstrom et al. 1996). D-området har en ”hengsele” funksjon, som deltar i dannelsen av dimerer (Steinmetz et al. 2001).



Figur 1.2 Skjematisert presentasjon av NGFI-B.

AF-1: Aktiverings sete 1

DBD: DNA-bindingsdomene

LBD: Ligand-bindingsdomene

Figuren er en modifisert utgave hentet fra Moll et al. 2006.

En av heterodimeringspartnerene til NGFI-B er retinoid X reseptor (RXR) (Perlmann and Jansson 1995) og RXRs ligand, 9-*cis*-retinoidsyre (9cRA) (Heyman et al. 1992), induserer transaktivering av RXR/NGFI-B heterodimere (Perlmann and Jansson 1995). RXR ligander er sett å hemme translokalisasjonen av RXR/NGFI-B heterodimeren fra kjernen til mitokondriene og dermed hemme apoptose (Cao et al. 2004).

Det er ikke kjent hvordan NGFI-B reguleres *in vivo*, men de to mest sannsynlige reguleringsmekanismene er ved protein uttrykk og ved posttranslasjonelle modifikasjoner f.eks fosforyleringer (Wingate and Arthur 2006).

Fosforylering av NGFI-B ble først vist i PC12 celler hvor NGF stimulering ble funnet å gi en forflytning av NGFI-B båndet på en SDS/polyakrylamid gel (Fahrner et al. 1990). Andre studier i PC12-celler har vist at KCl- og EGF-behandling gir ulike båndendringer, noe som indikerer at NGFI-B blir fosforylert på flere steder (Hazel et al. 1991).

Et fosforyleringssete som har blitt indentifisert er Ser-350, som ligger i C-terminalregionen av DBD og har blitt foreslått å virke på binding til DNA, da fosforylering reduserer muligheten for NGFI-B å binde seg til NBRE (Hirata et al. 1993). Det er vist at NGF induserer endringer i fosforyleringen av Ser-350 fulgt av deaktivering av NGFI-Bs transkripsjonsegenskaper (Katagiri et al. 1997; Katagiri et al. 2000). Det har blitt gjort flere forsøk på å finne hvilke kinaser som fosforylerer Ser-350, men man har ikke lyktes i å finne noe klart svar. Man antar at Akt (PKB) kan ha en rolle i fosforyleringen av Ser-350 (Pekarsky et al. 2001). Senere er det blitt vist at p90 ribosomal S6 kinase (RSK) fosforylerer Ser-350 i celler og at stimuli som aktiverer RSK, f.eks PMA, induserer fosforylering av Ser-350. Dette blokkeres både

av hemmere av RSK og hemmere av extracellular-signal-regulated-kinase 1/2 (ERK 1/2) som er oppstrøms aktivator for RSK (Wingate et al. 2006).

Thr-142 har blitt identifisert som et *in vitro* fosforyleringssete for ERK2 (Slagsvold et al. 2002). Fosforylering av dette setet har blitt vist i CV-1 celler (Upublisert, personlig meddelelse Ragnhild Paulsen).

Ser-139 er et fosforyleringssete i celler for NGF induserbar kinase (Katagiri et al. 2000) og man antar at den mest sannsynlige kinasen er ERK 1/2 (Wingate and Arthur 2006).

Fosforylering av det N-terminale kinase domenet av "c-jun N-terminal kinase" (JNK) har også blitt rapportert, men setet har ennå ikke blitt identifisert. Det ble da foreslått at fosforylering av JNK fremmet kjerneeksport av NGFI-B og økt apoptose (Han et al. 2006).

NGFI-B er uttrykt i de fleste vev og celletyper (Watson and Milbrandt 1990) og er ofte overuttrykt hos mange ulike typer kreftceller. NGFI-Bs vekstfremmende egenskaper i kreftceller kan skje ved at NGFI-B undertrykker retinoider som vanligvis har en negativ effekt på vekstkontroll (Wu et al. 1997). I kontrast til dette induseres NGFI-B raskt ved apoptose i mange ulike typer celler, også nerveceller og kreftceller (Jacobs et al. 2004; Li et al. 1998). Det ble første gang vist i prostata kreftceller at ved apoptose forflytter NGFI-B seg fra kjernen til cytoplasma og angriper mitokondriene fulgt av cytokrom c frisetting (Li et al. 2000). Dette er også vist i korncellenevrone fra lillehjerne som ble behandlet med glutamat. Denne effekten blokkeres av EGF gjennom aktivering av ERK2 (Jacobs et al. 2004). Mekanismen for hvordan translokeringen til mitokondriene skjer og hvordan NGFI-B induserer apoptose har blitt vist. Dette skjer ved at NGFI-B interagerer med BCL-2 (1.4) via sitt ligand-bindingsdomene. Denne dimeriseringen er nødvendig for at NGFI-B skal translokeres til mitokondriene og for at det skal skje en induksjon av apoptose. Bindingssetet på BCL-2 er lokalisert til N-terminal loop-region, mellom BH3 og BH4 domenet. Når NGFI-B binder seg til BCL-2 får man en konformasjonsendring av BCL-2 som fører til at BH3-domenet kommer fram og BCL-2-proteinet går fra å beskytte mot apoptose

til å indusere apoptose (se også punkt 1.5) (Lin et al. 2004). Det er sannsynlig at BCL-2 på denne måten virker som et BH3-only protein (1.4.3).

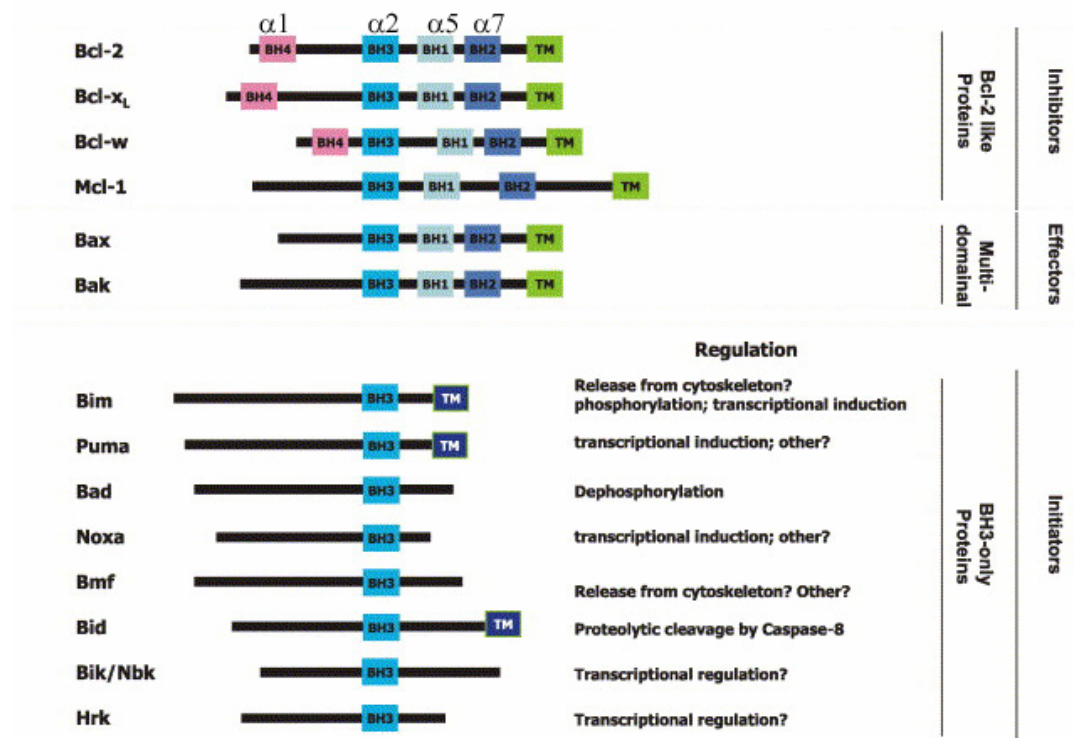
Nylig så man på interaksjoner mellom NGFI-B og hele familien av antiapoptotiske BCL-2 proteiner (BCL-2, BFL-1, BCL-B, MCL-1, BCL-W og BCL-X_L). NGFI-B interagerer med BCL-2, BFL-1 og BCL-B, men ikke med BCL-X_L, MCL-1 og BCL-W. NGFI-B interaksjon med BFL-1 og BCL-B omdannet disse til å indusere apoptose, sannsynligvis på lignende måte som for BCL-2. Den sterkeste NGFI-B-interaksjonen så man med BCL-B (Luciano et al. 2007).

Man vet ikke om de proapoptotiske medlemmene i BCL-2-familien interagerer med NGFI-B.

1.4 BCL-2 protein familien

BCL-2 og andre beslektede cytoplasma proteiner er nøkkelregulatorer av apoptose og er på denne måten viktige for at utvikling skjer korrekt, i tillegg til å opprettholde homeostase i vev og organer. Minst 20 familiemedlemmer har blitt isolert (Roset et al. 2007) og BCL-2-familien kan inndeles i tre kategorier: antiapoptotiske, proapoptotiske multidomene proteiner og pro-apoptotiske BH-3 only proteiner (Figur 1.3) (Tsujimoto and Shimizu 2000). En av deres typiske egenskaper er deres evne til å danne homo- og heterodimerer, noe som indikerer en nøytraliseringskonkurranse mellom disse proteinene. Måten denne dimeriseringen skjer på er ennå ikke fullstendig klarlagt. Man antar at den hydrofobe siden av BH3 α -helix hos BH3-only proteinene bindes til den hydrofobe kløften som dannes av BH1, BH2, BH3 domenene hos de proapoptotiske BCL-2-familiemedlemmene (se også under BCL-X_L) (Sattler et al. 1997). Når det gjelder de proapoptotiske medlemmene i BCL-2-familien ser det ut til at BH3-domenet er nødvendig for deres proapoptotiske egenskaper (Chittenden et al. 1995; Hunter and Parslow 1996).

Totalt sett er det de relative konsentrasjonene av anti-apoptotiske og pro-apoptotiske proteiner som bestemmer om cellen går inn i apoptose. I tillegg vil post-translasjonelle modifiseringer eller endringer i proteinkonformasjonen kunne endre affiniteten mellom de ulike proteinene og regulere kompleksdannelsen.



Figur 1.3 Struktur og funksjon av et utvalg av BCL-2-familieproteinene. Proteinene er gruppert i 3 funksjonelle familier. BCL-2 homologe (BH) domener er indikert.

8 α helikser har blitt identifisert hos BCL-X_L ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ og $\alpha 8$ er ikke vist), der en kjerne av to hydrofobe helikser ($\alpha 5$ og $\alpha 6$) omringes av 5 amfipatiske helikser og en fleksibel ikke konservert loop binder $\alpha 1$ - til $\alpha 2$ -heliksen (Muchmore et al. 1996).

TM: Membran forankringsdomene.

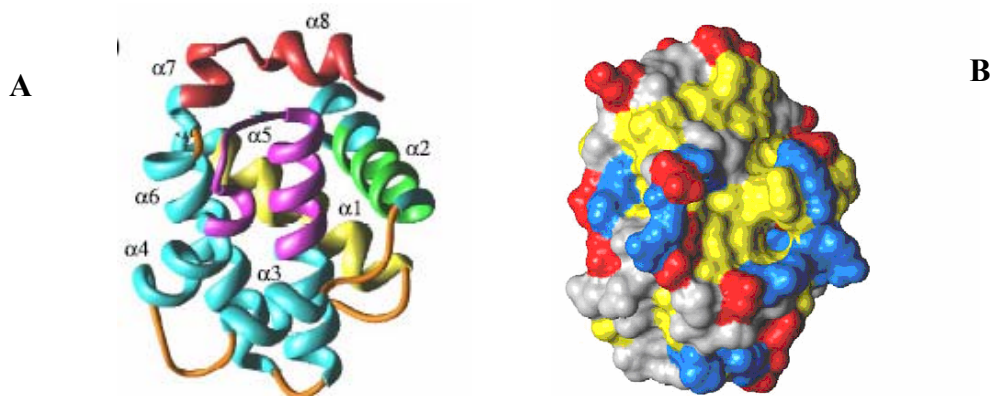
Figuren er en modifisert utgave hentet fra Georg Häcker et al. 2007.

1.4.1 Anti-apoptotiske BCL-2 proteiner

Disse proteinene har sekvenser som ligner BCL-2 proteinet og består av 4 BCL-2 homologe (BH) domener som er nødvendige for deres anti-apoptotiske egenskaper (Hirotani et al. 1999; Yin et al. 1994). Proteinene hemmer apoptose i respons til mange cytotoxiske skader. Deres hydrofobe karboksylterminal gjør at de kan binde seg til cytoplasmasiden på tre intracellulære-membraner; den ytre mitokondrie-membranen, endoplasmatiske retikulum og kjernemembranen (Cory and Adams 2002). I fravær av apoptotisk stimulus vil BCL-2 og BCL-X_L proteinene beskytte den mitokondrielle-ytermembranen mot BAXs og BAKs proapoptotiske aktivitet (Lindsten et al. 2005).

- **BCL-X_L proteinet (Bcl-2 associated X protein Large)**

I 1993 ble BCL-X proteinet klonet og det ble vist at *bcl-x* genet kodet for flere alternative spleisede mRNA, der BCL-X_L er hovedtranskriptet. BCL-X_L er 29 kDa og ligner på mange måter BCL-2 (Boise et al. 1993). BCL-X_L finnes i motsetning til BCL-2 både i cytosol og intergrert i membraner og studier har vist at proteinlokaliseringen endrer seg ved apoptose (Hsu et al. 1997). Membranlokaliseringen av BCL-X_L er spesifikt rettet mot mitokondrienes yttermembran til tross for at det ikke er noen tydelig forskjeller i transmembrant domene (TM) hos BCL-2 og BCL-X_L (se punkt om BCL-2) (Beilharz et al. 2003; Kaufmann et al. 2003). BCL-X_L er det første proteinet i BCL-2-familien som er blitt kartlagt ved røntgenkrystallografi og NMR-spektroskopi. Proteinets består av 8 α -helikser (Figur 1.4) som henger sammen via looper med ulike lengder. Som nevnt har man to sentrale helikser ($\alpha 5$ og $\alpha 6$) som er omgitt av de andre α -heliksene. Den lange loopen mellom $\alpha 1$ - og $\alpha 2$ -heliksene er ikke involvert i den antiapoptotiske funksjonen til BCL-X_L, men man antar den er involvert i negativ regulering av proteinet som vist for BCL-2 (se neste punkt) (Muchmore et al. 1996; Yamamoto et al. 1999). BH1, BH2 og BH3 danner toppen på en hydrofob kløft og bunnen av denne er dannet av $\alpha 3$ - og $\alpha 4$ -heliksene. Det er her interaksjonen med proapoptotiske medlemmer (f.eks BAD) av BCL-2-familien skjer (Sattler et al. 1997).



Figur 1.4 A viser strukturen av BCL-X_L der α -heliksene er illustrert som bånd.

BH1-regionen er farget rosa, BH2-regionen er farget rød, BH3-regionen er farget grønn og BH4-regionene er farget gul. Den lange loop-regionen mellom $\alpha 1$ - og $\alpha 2$ -heliksene er ikke tatt med.

B viser overflatestrukturen for BCL-X_L.

Den hydrofobe kløften er farget gul og kan tydelig sees på figuren.

Figuren er hentet fra Petros et al. 2003.

Den tre-dimensjonale strukturen til BCL-X_L har vist seg å ha likheter med de poredannende domenene hos difteritoxinet noe som kan indikere at BCL-2-familieproteiner kan virke som poredannende proteiner (se også punkt 1.5) (Muchmore et al. 1996). Dette har også blitt vist i syntetiske lipidmembraner (Minn et al. 1997).

Man trodde lenge at heterodimerisering mellom BAX og BCL-X_L var essensielt for BCL-X_Ls antiapoptotiske funksjon, men det ble senere vist at BCL-X_L beskytter mot apoptose også uten denne interaksjonen (Cheng et al. 1996).

- **BCL-2 proteinet (B-Cell Lymphoma-2)**

bcl-2 ble klonet i 1984 fra et lymfom som overuttrykte *bcl-2* som et resultat av kromosomal translokering (Pegoraro et al. 1984). *bcl-2* transkriptet koder for to typer BCL-2 proteiner der det ene er 26 kDa (BCL-2 α) og det andre er 22 kDa (BCL-2 β) (Tsujimoto and Croce 1986). Lokalisering av BCL-2 i cellen har tidligere blitt undersøkt. Det viste seg da at BCL-2 kun var lokalisert til ER membranen, mitokondriemembranen og kjernemembranen. Karboksylterminalens hydrofobe domene hos BCL-2 er viktig ved membrandokking, men eliminering av denne har ingen betydning for overlevelsesfunksjonen til BCL-2 (Nguyen et al. 1993). Den tre-dimensjonale strukturen til BCL-2 har også blitt karakterisert. Strukturen er svært lik BCL-X_L, men det ser ut til at den hydrofobe kløften er noe videre hos BCL-2 og det er også visse ladningsforskjeller her. Konsekvensen er at BCL-2 binder BH3-only proteinene 10 ganger svakere enn BCL-X_L (Petros et al. 2001).

Det ble tidlig vist at BCL-2 var involvert i å hemme apoptose (Vaux et al. 1988) og det er nå vist at proteinet beskytter mange typer celler mot de fleste former for apoptotisk celledød og visse former for nekrotisk celledød (Tsujimoto and Shimizu 2000). BCL-2 uttrykkes i lave konsentrasjoner i nevroner i hjernen, men induseres i mange nevroner ved ischemi (Chen et al. 1995; Merry and Korsmeyer 1997). Oppreguleringen av BCL-2 øker nevronenes motstandskraft mot ischemi for en lengre periode og ødeleggelse av *bcl-2* genet eller behandling med antisens-RNA øker hjerneskaden etter ischemi/reperfusjon (Chen et al. 2000).

Hvordan BCL-2 reguleres er ennå ikke klarlagt. Proteinets lang halveringstid og regulering av proteinuttrykk er begrenset (Reed 1996). Det er vist at ved å fosforylere proteinet flere steder får man en inaktivering av BCL-2 (Yamamoto et

al. 1999). Foreløpig er det vist tre fosforyleringssteder for BCL-2, serine 70, serin 87 og threonin 69, som alle ligger i det lange loop-området mellom $\alpha 1$ - og $\alpha 2$ -heliksene (Ito et al. 1997; Yamamoto et al. 1999). Ved å erstatte disse med alanin, fikk man en økt antiapoptotisk aktivitet etter påvirkning av fysiologiske dødssignaler (Yamamoto et al. 1999). Vanligvis binder BCL-2 seg til BAX og inaktiverer BAX proteinet, men det er usikkert om fosforylert BCL-2 fortsatt har denne evnen. En studie viser at fosforylert BCL-2 har mistet evnen til å hetrodimerisere med BAX (Ito et al. 1997), mens andre undersøkelser har vist at fosforylert BCL-2 fortsatt er bundet til BAX (Scatena et al. 1998).

1.4.2 Pro-apoptotiske multidomene BCL-2 proteiner

Disse proteinene deler homologe sekvenser i BH1, BH2 og BH3, men ikke i BH4. Gruppen inkluderer BAX, BAK, MTD (BOK) og DIVA (Figur 1.3) (Tsujimoto and Shimizu 2000).

- **BAX (Bcl-2 Associated protein X)**

Det er undersøkt om BCL-2 interagerer med andre proteiner. Det ble indentifisert en proteinpartner på 21 kD, BAX, som har utbredt aminosyrehomologi med BCL-2 (Oltvai et al. 1993). Dette gjelder først og fremst i BH1 og BH2 domenene.

Flere ulike spleisevarianter av BAX har blitt indentifisert (Apte et al. 1995; Thomas et al. 1999; Zhou et al. 1998) men det er ikke kjent hvilken funksjon disse formene av proteinet har. BAX uttrykkes uten noen spesiell vevsspesifisitet. p53

oppregulerer uttrykket av *bax* genet *in vitro*. Oppregulering av BAX proteinet har blitt sett ved ulike typer celledød f.eks i nevroner etter cerebral ischemi (Brady and Gil-Gomez 1998).

BAX har strukturlikheter med BCL-2 og BCL-X_L. BAX har sju α -helikser som omgir to sentrale hydrofobe α -helikser. Heliks 9 som korresponderer til den transmembrane α -heliksen hos BCL-2 og BCL-X_L, bindes inn i den hydrofobe kløften i proteinet. Bindingsstedet korresponderer til det stedet på BCL-X_L som binder BAD. På denne måten beskytter $\alpha 9$ -heliksen den hydrofobe kløften hos BAX. Dette kan være med på å øke løseligheten for proteinet ved ikke-apoptotiske tilstander (Suzuki et al. 2000). BAX er primært lokalisert i cytosol som en monomer og løst festet til mitokondrienes yttermembran i ikke-

apoptotiske celler (Antonsson et al. 2000; Hsu and Youle 1998). Som respons til en apoptotisk stimulus er det foreslått at BAX gjennomgår en konformasjonsendring, slik at en N-terminal epitop kommer fram. Transmembrant domene (TM) frigjøres og en hydrofob lomme blir tilgjengelig for oligomerisering. Både N- og C-terminalen hos BAX endrer seg ved aktivering (Desagher et al. 1999; Nechushtan et al. 1999) og det er antydning at disse kan være involvert i binding til mitokondrietytermembranen (Schinzel et al. 2004). C-terminalens α -helix frigjøres fra BH3-domenet slik at BH3-domenet blir tilgjengelig for interaksjoner som kan føre til komplekdannelse (Suzuki et al. 2000). N-terminalen spiller en rolle i proteinets retensjon i cytosol og denne kan derfor være en hemmer av mitokondriell translokering (Goping et al. 1998). Etter aktivering ser man at BAX befinner seg i den ytre mitokondriemembranen som store oligomere (Antonsson et al. 2001; Hsu et al. 1997).

1.4.3 Proapoptotiske BH3-only BCL-2 proteiner

BH3-only proteinene ser ut til å være ansvarlig for å aktivere apoptose som respons til utviklingssignaler eller intracellulær skade (Cory and Adams 2002). Åtte proteiner inkluderes vanligvis i denne gruppen, BAD, BIK, BIM, HRK (DP5), PUMA, NOXA, BMF, BID og disse deler homologi i BH3-regionen (Figur 1.3) (Hacker and Weber 2007). Med unntak av BID, antar man at de virker ved å binde til og nøytralisere de antiapoptotiske proteinene. For å indusere celledød er BH3-only proteinene avhengig av at BAX eller BAK er til stede (Zong et al. 2001).

- **BAD (Bcl-x_L/bcl-2 Associated Death promoter homolog)**

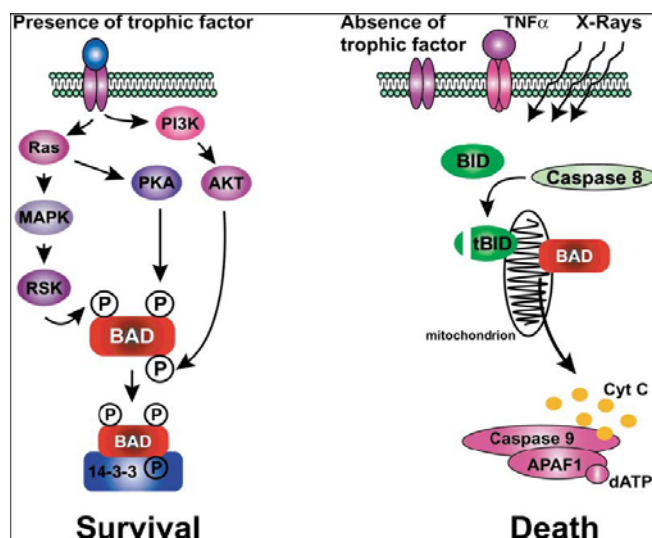
BAD cDNA sekvens ble funnet i nyfødt musehjerne og voksen musethymus.

Genet kodet for et hittil ubeskrevet protein som bestod av 204 aminosyrer og med en molekylvekt på 22,1 kDa (Yang et al. 1995).

Aktiv (ufosforylert) BAD induserer apoptose ved å hemme antiapoptotiske BCL-2-familiemedlemmer (som BCL-X_L) og tillater dermed to andre proapoptotiske proteiner, BAX og BAK, å aggregere og indusere frigjøringen av cytochrom c, caspaseaktivering og apoptose (Cheng et al. 2001; Wei et al. 2001). I cellekultureksperimenter vil tilsetningen av overlevelsesfaktorer korrelere med fosforyleringen av BAD på Ser-112, Ser-136 og Ser-155, noe som resulterer i

bindingen av BAD til 14-3-3 proteiner og som gir et inaktivt kompleks (Figur 1.5) (Datta et al. 1997).

Kinasene som fosforilerer BAD er lokalisert både i cytosol og i mitokondriene. Mekanismen for at BAD fosforileres av mitokondriekinasen uten å assosiere med BCL-2-familie proteiner er ikke kjent, men det er foreslått at BAD har høyere affinitet for disse kinasene enn for BCL-2-familie proteinene. En annen mulighet er at BAD er avhengig av en "chaperone" for å bli ledet til BCL-X_L, som er dens naturlige bindingspartner ved mitokondrieyttermembranen (Schinzel et al. 2004). Ved kalsiumindusert apoptose har det blitt vist at calsineurin defosforilerer BAD, som igjen fører til translokering av BAD og interaksjon med BCL-X_L (Wang et al. 1999). Andre mekanismer for hvordan BAD dissosierer fra 14-3-3 er også foreslått, f.eks kløyving av 14-3-3 av caspase-3 som videre gir aktivering av BAD (Won et al. 2003).



Figur 1.5 Overlevelsessignal via BAD fosforilyring.

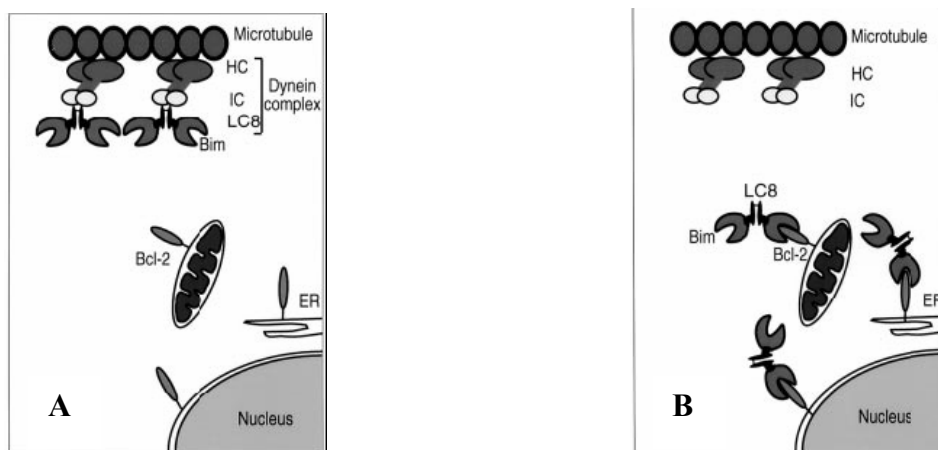
Vekstfaktoravhengig BAD-fosforilyring regulerer celleresponsen ved stresspåvirkning fra omgivelsene ved å øke terskelen for cytokrom c frigjøring fra mitokondriene og ut i cytoplasma. I celler der BAD er fosforylert vil man ha økt motstand mot indre og ytre stresspåvirkning. Se også tekst.

Figuren er hentet fra Bergmann 2002.

- **BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death)**

I et forsøk på å finne nye proteiner som kunne interagere med BCL-2 oppdaget O'Connor et al. i 1998 et nytt BH3-only protein som de kalte BIM. De fant 3 isoformer ved alternativ spleising, *bim_{EL}*, *bim_L* og *bim_S*. De fant også at BIM

interagerer med noen, men ikke alle BCL-2-familieproteiner som fremmer celleoverlevelse og kun de antiapoptotiske proteinene som bandt BIM kunne nøytralisere dets toksisitet. Det så derfor ut til at BIM representerte en dødsligand med en spesifisitet rettet mot spesielle antiapoptotiske medlemmer av BCL-2-familien (O'Connor et al. 1998). Det er vist at BIM_{EL} er induisert i mange ulike typer nerveceller når man fjerner NGF og ved K⁺ deprivering i kornceller fra cerebellum (Putcha et al. 2001; Whitfield et al. 2001). I friske celler hemmes BIM ved at det direkte interagerer med LC8 cytoplasma dynein lettjede som er en del av et mikrotubuliassosiert dynein-motor kompleks. Ved ulike typer apoptosesignal frigjøres et kompleks av BIM og LC8 som translokteres til BCL-2 (Figur 1.6). Dette er en caspase-uavhengig prosess og den er derfor en hendelse oppstrøms i apoptosesignalveien (Puthalakath et al. 1999). BIM_S bindes ikke til LC8 og er derfor en mer potent celledødsinduser enn BIM_{EL} og BIM_L (O'Connor et al. 1998; Puthalakath et al. 1999).



Figur 1.6 Modell for regulering av BIM i friske celler (A) og i apoptotiske celler (B).

I friske celler er BIM bundet til LC8 og til mikrotubuliassosiert dynein-motor kompleks som også består av dynein intermediære kjeder (IC) og dynein tunge kjeder (HC). Visse apoptotiske stimuli fører til frigjøring av BIM og LC8 kompleks og dette komplekset kan binde seg til BCL-2 og nøytralisere dets mulighet til å blokkere adaptorprotein mediert caspase aktivering. Figuren er hentet fra Puthalakath et al. 1999.

Det er ennå ikke vist hvordan BIM oppreguleres ved apoptosesignal. Etter studier av c-Juns effekt på BIM konkluderte Whitfield et al. i 2001 med at aktivering av transkripsjonsfaktoren c-Jun ved fosforylering av JNK, bidrar til induksjon av BIMs uttrykk. Dette er imidlertid ikke tilstrekkelig for å oppregulere BIM. Man antar derfor at det er en parallell signalvei som kan bidra til å indusere BIM i tilstrekkelig grad til

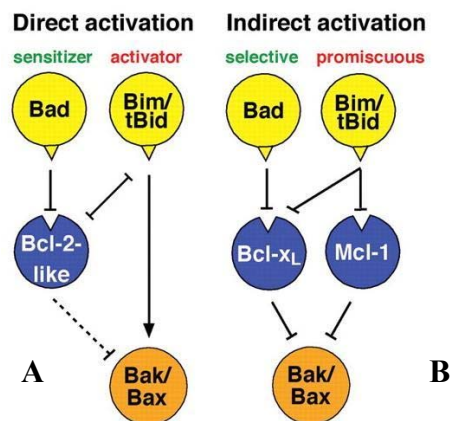
at man får aktivert BAX og frigjøring av cytokrom c og videre aktivering av caspase (se også punkt 1.5) (Putcha et al. 2001; Whitfield et al. 2001).

1.5 BCL-2-familiens rolle ved mitokondriell (intrinsic) apoptose

Denne typen apoptose reguleres av medlemmer i BCL-2-familien og ved mitokondriell apoptose er permeabilisering av mitokondriemembranen en av de mest sentrale hendelsene som igjen fører til frigjøringen av ulike molekyler avgjørende for apoptose (1.2). Det er et stort antall proapoptotiske signaler som kan indusere permeabilisering av yttermembranen i mitokondriene og videre apoptose. Disse aktiveres av ulike signalveier som fører til at de translokeres fra kjernen eller cytoplasma til mitokondriemembranen hvor de induserer permeabiliseringen (Brenner and Kroemer 2000). Vanligvis vil antiapoptotiske medlemmer i BCL-2-familien, spesielt BCL-2 og BCL-X_L, sitte i mitokondriemembranen der de hemmer disse apoptosemekanismene (Hsu et al. 1997; Vaux et al. 1988). En av disse proapoptotiske proteinene er NGFI-B som er vist å interagere med BCL-2 i mitokondriemembranen og indusere apoptose via BCL-2s BH3-domene (1.3). Det er vist at denne mekanismen er avhengig av et proapoptotisk multidomene protein i BCL-2-familien f.eks BAK (Lin et al. 2004).

BAX eller BAK er nødvendig for frigjøringen av cytokrom c fra mitokondriene og påfølgende aktivering av caspase-9-avhengig celledød (Li et al. 1997; Liu et al. 1996). Det er for tiden tre modeller for hvordan BAX eller BAK aktiveres og dermed initierer apoptose. En foreslått modell går ut på at aktivering av BAX eller BAK er avhengig av frigjøringen av BH3-only proteiner fra antiapoptotiske BCL-2-familiemedlemmer, f.eks BCL-2 og BCL-X_L. Disse BH3-only proteinene kan direkte binde seg til BAK eller BAX og initiere apoptose. I BH3-only gruppen er det kun BIM og tBID som har denne type aktivitet, men disse kan også bindes til og nøytraliseres av antiapoptotiske proteiner. Rollen til de andre BH3-only proteinene blir derfor å hindre at de antiapoptotiske proteinene inaktiverer BIM/tBID (Figur 1.7A) (Cartron et al. 2004; Certo et al. 2006; Kim et al. 2006; Kuwana et al. 2005; Letai et al. 2002). Den alternative modellen foreslår at BAX og BAK medierer apoptose uten å assosiere med BH3-only proteiner. I denne modellen vil BH3-only proteinene undertrykke antiapoptotiske proteiner som BCL-2 og BCL-X_L som

vanligvis hindrer BAX og BAK fra å bli aktivert (Figur 1.7B)(Chen et al. 2005; Willis et al. 2005; Willis et al. 2007). I begge modeller er det sentrale i mekanismene å degradere antiapoptotiske proteiner som BCL-2 og BCL-X_L og dermed tillate aktivering av BAX eller BAK.



Figur 1.7 Mulige aktiveringsveier av BAX/BAK

A: BH3-only proteiner (BIM/tBID) reagerer direkte med BAX/BAK og proteinet aktiveres.

B: BH3-only proteiner binder seg til antiapoptotiske proteiner i BCL-2-familien og hindrer at disse inaktiverer BAX/BAK. Dette er en indirekte aktiveringsvei.

Figuren er hentet fra Willis et al.2007.

En tredje mulighet er en kombinasjon av disse 2 modellene der noen BH3-only proteiner, f.eks BAD binder antiapoptotiske proteiner med høy affinitet og inaktiverer disse, mens andre, f.eks tBid direkte aktiverer BAX/BAK (Letai et al. 2002).

Det er også flere teorier for hvordan BAX og de andre multidomene proteinene induserer frigjøringen av cytokrom c og andre proteiner. Det er foreslått to mekanismer for permeabiliseringen av den mitokondrielle yttermembranen: dannelsen av spesifikke kanaler eller porer i yttermembrane, alternativt åpning av permeable porer som allerede finnes i membranen. Resultatet er i begge tilfeller mitokondriell svelling og oppløsning av yttermembranen.

Det er foreslått ulike modeller for hvordan dette skjer:

1) BAX kan danne kanaler på egen hånd. Dette er vist med rekombinant BAX, der man fikk laget kanaler i kunstige membraner. Disse kanalene var istand til permeabilisere lipidmembraner for cytokrom c (Antonsson et al. 1997; Saito et al. 2000).

- 2) BAX kan destabilisere mitokondriemembranen ved å induser hull i lipidlaget (Basanez et al. 1999).
- 3) BAX kan danne kanaler som kombineres med de spenningsavhengige anion-kanalene (VDAC). Det er vist at BAX og BAK kan indusere cytokrom c frigjøring når VDAC blir inkorporert i liposomer (Shimizu et al. 1999).
- 4) BAX kan trigge åpningen av den mitokondrielle ”permeability transition pore” (PTP). BAX kan interagere med PTP komplekset og permeabilisere membranen noe som igjen fører til cytokrom c frigjøring (Narita et al. 1998).

Mange av studiene som ligger til grunn for disse teoriene baserer seg på eksperimenter der man har brukt kunstige membraner, isolerte mitokondriemembraner, ekstraherte mitokondrieproteiner eller rekombinante proteiner. I intakte cellestrukturer er det vanskelig å slå fast de molekylære virkningsmekanismene og å kunne skille mellom de ulike modellene (Antonsson 2001).

1.6 Mål for oppgaven

Målene har vært å:

- 1) Finne en luciferasemetode som kan brukes til å studere interaksjoner mellom BCL-2-familieproteiner og NGFI-B i cellekultur .
- 2) Undersøke interaksjoner mellom BAX og NGFI-B og BAD og NGFI-B ved å bruke luciferasemetoden.
- 3) Undersøke om NGFI-B med Thr-142, Ser-139 og Ser-350 erstattet med alanin påvirker interaksjonen med BCL-2 ved bruk av luciferasemetoden.
- 4) Sette opp en ko-immunpresipitasjonsmetode for å kunne studere interaksjoner mellom BCL-2-familieproteiner og NGFI-B *in-vitro*.

2 Materialer og metoder

2.1 Kjemikalier og biologiske produkter

Produkt	Leverandør
Acrylamid 30% BIS solution	Bio-Rad California, USA
APS (Ammonium persulfat)	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
ATP (Adenosin 5'-Triphosphate)	Sigma-Aldrich
BES (N,N-Bis-(2-hydroxyetyl)-2-aminoetansulfonsyre)	Acros organics Geel, Belgia
BSA (Albumin fra bovint serum)	Sigma-Aldrich Co.
CaCl ₂	Merck & Co., Inc. New Jersey, USA.
Deoxycholate	Sigma-Aldrich Co.
D-Luciferin	Duchefa Haarlem, Nederland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Co.
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	Invitrogen Co. California, USA
ECL plus western blotting detection system	Amersham biosciences Buckinghamshire, England
EDTA (Etylendiamintetraeddiksyre)	Sigma-Aldrich Co.
Etanol (96%)	Arcus produkter Norge
FdA (Fluorescein diacetat)	Sigma-Aldrich Co.
Glycine	Sigma-Aldrich Co.
Glukose	Merck
Kalveserum, føtalt	Invitrogen Co.
Leupeptin 5mg/ml	Sigma-Aldrich Co.
2-merkaptetanol	Sigma-Aldrich Co.

Metanol	Merck
Mg(CH ₃ COO) ₂	Merck
NaCl	Mallinckrodt Baker B.V. Deventer, Nederland
Na ₂ PO ₄	Merck
Na-Pyruvat	Sigma Aldrich Co.
Na ₃ VO ₄ 10 mM	Sigma Aldrich Co.
Penicillin-streptomycin (10000 U/ml / 10000 µl/ml)	Invitrogen Co.
Pepstatin-A 1 mg/ml	Sigma Aldrich Co.
PI (Propidium iodide)	Sigma Aldrich Co.
PMSF 0,1 M (Pentametansulfonylfluorid)	Sigma Aldrich Co.
Ponceaus solution	Sigma Aldrich Co.
Protein A-sepharose	Pierce Rockford, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce
Sucrose	Merck
Supersignal West Femto	Pierce
TEMED (N,N,N,N,-tetrametyl-Etylendiamin)	Sigma-Aldrich Co.
Tris	MP Biomedicals Ohio, USA
TritonX-100	Sigma-Aldrich Co.
Trizma®Base, (Tris[hydroxymethanyl]Aminoethane)	Sigma-Aldrich Co.
Trypsin-EDTA	Invitrogen Co.
Tween 20	Calbiochem. California, USA
Tørrmelk	Normilk AS Levanger, Norge

2.2 CV-1 celler

CV-1 cellelinjen er en fibroblast-liknende celletype som stammer fra nyreceller fra Afrikansk grønnape (*Ceropithecus aethiops*) (Hopps et al. 1963).

2.2.1 Splitting av CV-1 celler

Prosedyren skjer i LAF-benk (Holten Safe 2000 Model 1.2).

Cellene splittes når de er konfluente hver 3. eller 4. dag. De dyrkes i 175 cm² cellekultur flasker (Nunclon Surface, Nunc) og inkuberes ved 37°C med 5 % CO₂ (Water sacheted incubator, Farma scientific).

Fremgangsmåte

Gammelt medium tømmes av.

2 ml trypsin-EDTA tilsettes, flasken beveges slik at bunnen skylles og løsningen fjernes deretter.

2 ml trypsin-EDTA tilsettes igjen, og las virke i ca. 30 sekunder før løsningen pipeteres av.

Flasken settes i inkubatorskap i 5-10 minutter.

Flasken tas ut og bankes på siden slik at cellene løsner.

10 ml CV-1 medium (Tabell 2.1) tilsettes i flasken og blandes godt med cellene.

1,5 ml av cellesuspensjonen tilsettes i en cellekulturflaske og blandes med 20 ml medium.

Den nødvendige mengden cellesuspensjon til det antallet skåler som skal lages tas ut og blandes med medium.

Beregning av hvor mye cellesuspensjon som er nødvendig ved splitting til skåler:

$$\text{Antall ml} = \frac{\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times \text{ønsket celletetthet per ml}}{\text{celletetthet i flasken}}$$

Cellene ble sådd ut i en tetthet på $3,5 \times 10^6$ celler/ml.

Tabell 2.1 Cellekulturmedium til dyrking av CV-1 celler

Innholdsstoffer	Mengde
Føtalt kalveserum	50 ml
Natrium Pyruvat (fra 100x stockløsning)	5 ml
Penicillin-Streptomycin (fra 100x stockløsning)	5 ml
Dulbeccos MEM	500 ml

2.2.2 Transfeksjon av CV-1 celler med CaCl_2

Transfeksjon av CV-1 celler skjer dagen etter splitting av cellene med kalsiumfosfat presipitasjonsmetoden (Graham and van der Eb 1973).

For Westernblotting og immunpresipitering ble cellene dyrket i skåler på 10 cm med 10 ml medium. For luciferasemålinger ble cellene dyrket i skåler på 5,8 cm med 3,3 ml medium.

Prosedyren skjer i LAF-benk.

Fremgangsmåte

Transfeksjonsløsningen lages ved å blande like mengder BBS (Tabell 2.2) og 0,25M CaCl_2 (fortynnet MQ vann og sterilfiltrert 0,2 μm).

Til 1 ml transfeksjonsløsning tilsettes totalt 10 μg DNA (Tabell 2.3).

Eppendorfrøret whirlmikses i 10+5 sek og inkuberes i 20 minutter ved romtemperatur.

Blandingen tilsettes deretter dråpevis til en skål mens skålen beveges forsiktig.

Skålene inkuberes ved 37°C med 5% CO_2 .

Medium byttes dagen etter.

Tabell 2.2 BBS buffer

Innholdsstoffer	Slutt-konsentrasjon	Mengde
BES	50 mM	5,333 g
Na ₂ HPO ₄	2 mM	0,134 g
NaCl (5M)	280 mM	28,0 ml
MQ vann		ad 500ml

pH justeres til 6.75, 6.85, 6.95, 7.00, 7.05. med NaOH og HCl.

Løsningene sterilfiltreres (0,2 µm) og undersøkes for best transfeksjons effektivitet.

Tabell 2.3 Plasmider til transfeksjon

Genprodukt	Kilde	Plasmid kort-navn	Plasmid konsentrasjon transfektert
Ildflueluciferase	Promega	RSV-luc	0,15 µg/ml
Ildflueluciferase	(Wilson et al., 1991)	NBRE-luc (A8)	1 µg/ml
Renillaluciferase	Promega	rl-CMV	0,1 µg/ml
GFP	Gave fra AnneCarine Østvold, Med. Biokjemi, UIO	Adgfp	4 µg/ml
GFP-merket NGFI-B	(Jacobs et al., 2004)	NGFI-B-GFP	1 µg/ml
NGFI-B-wt	(Wilson et al., 1991)	NGFI-B-wt	1 µg/ml
Tomt	(Wilson et al., 1991)	CMV	Tilsettes opp til 10µg/ml
BCL-2	Gave fra Strasser, WEHI, Australia	BCL-2	0,5-4 µg/ml
BAX	Gave fra Strasser, WEHI, Australia	BAX	0,5-4µg/ml
BCL-X _L	Gave fra Strasser, WEHI, Australia	BCL-X _L	0,5-4 µg/ml

BAD	Gave fra Strasser, WEHI, Australia	BAD	0,5-4 µg/ml
BIM _{EL}	Gave fra Strasser, WEHI, Australia	BIM _{EL}	0,5-4 µg/ml
BIM-yfp	Eugene Johnson, Wash- U, USA	BIM-yfp	4 µg/ml

2.3 Mikroskopering

Et molekyl eller atom kan absorbere elektromagnetisk energi og dermed komme inn i en høyere elektronisk, vibrerende eller roterende tilstand. Fluoroforer absorberer elektromagnetisk energi ved en spesifikk bølgelengde og kommer inn i en mer energirik tilstand. Når molekylet går tilbake til en lavere energitilstand vil det sende ut stråling med lengre bølgelengde (Petty 2007).

”Green fluorescent protein” (gfp) ble klonet fra *Aequorea victoria* i 1991 (Prasher et al. 1992). Gfp er et fluorescerende protein som ikke trenger andre ko-faktorer eller substrat for dannelsen av grønt lys. Ved kun å utsette GFP for langbølget lys (f.eks fra fluorescensmikroskop) vil det dannes bioluminescens som kan studeres i mikroskop. Dette brukes i praksis ved at man subkloner GFP med ønsket gen og introduserer dette til organismen eller cellekulturen. Resultatet er et protein med en grønn hale som vil være synlig i fluorescensmikroskop. På denne måten kan man studere lokalisasjonen til proteinet i en levende celle. Det er imidlertid viktig å være klar over at GFP-halen er relativ stor (27 kDa) og kan derfor påvirke det aktuelle proteinets funksjonalitet (Misteli and Spector 1997). Emisjonsmaksimum er for GFP 507 nm og for YFP (”yellow fluorescent protein”) 527 nm.

2 døgn etter transfektering ble cellene undersøkt i fluorescensmikroskop (Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop). Det ble tatt digitale bilder av celler transfektert med fluorescerende plasmider med kamera koblet til mikroskopet (Spot RT fargebildekamera). Programvaren som ble benyttet var programmet Spot Advanced.

2.3.1 Farging

Fluorescein diacetat (FdA) er et substrat for esteraser, enzymer som er tilstede i alle celletyper. FdA kan penetrere levende celler og hydrolyseres til fluorescein. Dette er et fluorescerende, ladet produkt og blir derfor fanget inne i cellene. Cellene med fluorescein kan på denne måten bli synlig i fluorescensmikroskop. FdA farging kombineres med å farge cellene med Propidium iodid (PI). Dette er et ladet stoff som ikke tas opp av celler med intakte membraner. Hos celler der cellemembranen er skadet vil PI tas opp og bindes til DNA og dsRNA og gi fluorescens. Metoden vil derfor kunne skille mellom levende og nekrotiske celler, men ikke apoptotiske der cellene dør uten at cellemembranen ødelegges.

Fargemetoden vil gjøre at man får farget levende celler grønne og døde celler blir røde. Begge fargene eksiteres av blått lys og man bruker blått filter for å se de grønne cellene og grønt filter for å se de røde cellene (Darzynkiewicz et al. 1994).

Fremgangsmåte

Mediet fjernes og cellene vaskes med 1 x 2 ml Lockes løsning uten magnesium (Tabell 2.4).

Hver skål tilsettes 4,5 ml Lockes løsning uten magnesium.

Deretter tilsettes 4,5 µl PI/FdA slik at sluttkonsentrasjonen blir henholdsvis 4,6 µg/ml og 15 µg/ml.

Inkuberes i romtemperatur i 3 minutter.

Løsningen fjernes og skålene vaskes med 2 x 2 ml Lockes løsning uten magnesium.

2 ml Lockes løsning uten magnesium tilsettes hver skål.

Skålene undersøkes i fluorescensmikroskop og antallet levende/døde celler telles.

Tabell 2.4 Lockes løsning uten magnesium

Innholdsstoffer	Slutt-konsentrasjon	Mengde
CaCl ₂	2,3 mM	0,34 g
NaHCO ₃	3,6 mM	0,30 g
HEPES(pH 7,4)	5,0 mM	1,19 g
KCl	5,6 mM	0,42 g
Glukose	5,6 mM	1,00 g
NaCl	154,0 mM	9,00 g
Destillert vann		ad 1000 ml

2.4 Luciferase

Ildflueluciferase ble karakterisert hos ildfluen *Photinus pyralis* i 1966 (Travis and McElroy 1966).

D(-)-luciferin aktiveres av ATP-Mg og danner et D(-)-luciferyl adenylat derivat samtidig som pyrofosfat frigjøres. Denne reaksjonen katalyseres av ildflueluciferase. Enzymkomplekset som da dannes, reagerer med molekylært oksygen og man får dannet et svært energirikt kompleks- et "dioxetanon". Dette komplekset er ustabilt og oksygenbindingene vil etter kort tid brytes og det blir dannet CO₂ og oxyluciferin i eksitert tilstand. Bioluminescens vil dermed kunne observeres (Seliger et al. 1961).

Renillaluciferase ble også beskrevet i 1966 hos *Renilla reniformis* (Hori and Cormier 1966). Renillaluciferase-systemet er litt forskjellig fra ildflueluciferase-systemet. Den aktive substansen coelenterazine er ikke i et fotoprotein men er bundet til et luciferin bindende protein som ved tilsetning av kalsium frigjør luciferin. Luciferin bindes til renillaluciferase hvor det skjer en oksidering fulgt av en dekarboksylering og dannelsen av et produkt som emitterer lys (Lee 2001).

2.4.1 Høsting av celler til måling av ildflue- og renilla-luciferase

Skålene høstes 2 døgn etter transfeksjonen av CV-1 cellene.

Fremgangsmåte

Mediet tømmes av og restene fjernes med en pipette.

Skålen vaskes 2 ganger med 2 ml iskald PBS (Tabell 2.5). Alle rester med PBS fjernes etter andre vask med en pipette.

300 µl 0,1% luciferase med 1 mM DTT (Tabell 2.5) avsettes midt på skålen.

Skålene inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.

Cellene skrapes av med en celleskrape i to retninger vinkelrett på hverandre.

Cellesuspensjonen overføres til et eppendorfrør på is.

Rørene sentrifugeres i en kjølesentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus instruments) ved 4°C i 5 minutter ved 13000 rpm (16000 x g) og settes tilbake på is.

Tabell 2.5 Løsninger til høsting av celler for ildflue- og renilla-luciferase

Løsning	Innholdsstoffer	Slutt-konsentrasjon	Mengde
0,1% Luc	Tris-1 M MES (1M, pH 7,8)	50 mM	5,0 ml
	Triton X-100	0,1 %	0,1 ml
	MQ vann		ad 100 ml
DTT	Dithiothreitol	500 mM	77,2 mg
	MQ vann		1,0 ml
PBS	NaCl	140 mM	32,0 g
	KCl	2,7 mM	0,8 g
	KH ₂ PO ₄	1,2 mM	1,08 g
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	11,3 mM	7,08 g
	MQ-vann		ad 4000 ml
	pH justeres til 7,4 med HCl og NaOH.		

2.4.2 Måling av luciferase

Fremgangsmåte for ildflueluciferase måling

50 µl av supernatanten fra cellehøstingen blandes med 150µl LUC-coktail (Tabell 2.6) i et 5 ml plastrør (Sarstedt).

Prøven settes i luminometeret (Lumat LB 9507® fra EG&G Bertold) og 100 µl luciferin (Tabell 2.6) tilsettes via en dispenser. Lysintensiteten måles i 2 sekunder.

Fremgangsmåte for renillaluciferase måling

100 µl 1x renilla S&G reagens blandes med egnet prøvevolum av supernatanten i et 5 ml plastrør. Kurven undersøkes for linearitet.

Prøven settes i luminometeret. Lysintensiteten måles.

Tabell 2.6 Løsninger til måling av ildflueluciferase og renillaluciferase

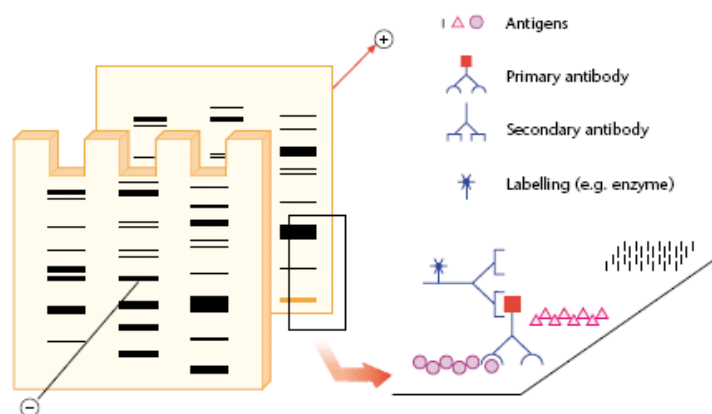
Løsning	Innholdsstoffer	Slutt-konsentrasjon	Mengde
Luciferin	D-Luciferin tørrstoff	1 mM	30,0 mg
	MQ vann		100 ml
	Lysbeskyttes		
LUC-coktail	ATP(Adenosine 5-triphosphate)	4 mM	240 mg
	Magnesiumacetat (1M)	20 mM	2 ml
	1M Tris-1M MES pH 7,8	83 mM	8,3 ml
	MQ-vann		ad 100 ml

Cellene ble transfektert med NGFI-B ildflueluciferase reportergen (NBRE-luc), sammen med NGFI-B-wt/NGFI-B-gfp. De relative luciferase enhetene (RLU) man får ved måling vil derfor si noe om hvor mye NGFI-B som befinner seg i cellekjernen og fungerer som en transkripsjonsfaktor.

Cellene har også blitt transfektert med rl-CMV. Renillaluciferase benyttes som en intern standard som vil korrigere for ulike variabler som f.eks transfeksjonseffektivitet og celledensitet.

2.5 Westernblotting

Blotting metodene består vanligvis av 4 trinn (Figur 2.1): elektroforese, overføring til papir, binding av analytisk probe til målmolekylet på papir og visualisering av bundet probe. Blandingen av proteiner separeres i ulike komponenter ved elektroforese gjennom en SDS-polyakrylamid gel. Proteinene overføres deretter til et nitrocellulose papir. Primært antistoff bindes deretter til målproteinene og immobiliseres ved blotting. De spesifikke antistoffene som brukes som analytisk probe er i dette tilfellet rensede polyklonale antistoffer. Antigen-antistoff komplekset kan deretter identifiseres med antistoffer for primær antistoffet, som er merket med f.eks horseradish peroksidase (HRP). Disse kan visualiseres med framkallingsvæske som Femto (Hayes et al. 1989).



Figur 2.1 Skjematisk fremstilling av utførelsen av Westernblotting.

Etter at proteinene er separert gjennom en gel overføres proteinene til en membran. Denne påføres primærantistoffer og etter vasking påsettes enzymkonjugerte sekundærantistoffer som kan detekteres som kjemisk luminesens.

Figuren er hentet fra Bjerrum 2001.

2.5.1 Høsting av celler til Westernblotting

Skålene ble høstet 2 døgn etter transfeksjon av cellene.

Prosedyre for høsting av celler til Westernblotting fra store skåler

Mediet helles av skålene og restene suges av.

Skålene vaskes 2 ganger med 3 ml PBS (Tabell 2.5).

Skålene tilsettes 100 µl 2% SDS i PBS.

Cellene skrapes i to retninger med celskraper og overføres til eppendorfrør på is.

Løsningene kokes ved 95°C i 2 minutter.

Løsningene fryses ved -80°C.

Prosedyre for høsting av celler til Westernblotting fra medium skåler

Mediet helles av skålene og restene suges av.

Skålene vaskes 2 ganger med 1 ml PBS.

Skålene tilsettes 70 µl Laemmli-buffer (Tabell 2.7).

Cellene skrapes i to retninger med celskraper og overføres til eppendorfrør på is.

Løsningene kokes ved 95°C i 2 minutter.

Løsningene fryses ved -80°C.

Tabell 2.7 Løsninger for høsting av celler til Westernblotting

Løsning	Innholdsstoffer	Slutt-konsentrasjon	Mengde
SDS	Natrium dodecyl sulfat (SDS)	20 %	200 g
	MQ-vann		900 ml
	Justeres til pH 7,2 med HCl/NaOH		
Laemmli-buffer	Øvre gel buffer (Tabell 2.8)		10 ml
	SDS (20%)	3.0%	2 ml
	Sucrose	4,4 M	2 g
	EDTA (0,5M)	7,4 mM	200 µl
	2-merkaptoetanol	10%	1,356 ml
	Noen korn bromfenolblott		

2.5.2 Metode for Westernblotting

Gelstøping

Det ble laget 0,75 mm tykke, 10 brønns geler.

Platene vaskes med sprit slik at alt fett forsvinner. Støpeformen settes sammen.

Løsning for polyakrylamid gel 6%/10% lages (Tabell 2.8).

Løsningen helles i spalten mellom de to glassplatene.

Vann tilsettes på toppen slik at gelen får en rett linje.

Gelen stivner i løpet av 30 min.

Vannet helles av og restene suges opp med et tørkepapir.

Løsning for "stacking gel" (4%) lages (Tabell 2.8) og helles over 6%/10% gelen. En kam med 10 tagger settes i. Gelen stivner i løpet av 30 min.

Elektroforese

Glassplatene med gelen vaskes under vann og kammen tas ut.

Glassplatene plasseres i et kar med åpningen inn mot midten.

Det indre kammeret fylles med elfo buffer (Tabell 2.8). Det andre kammeret etterfylles hvis nødvendig.

Luftbobler fjernes med en sprøyte.

En påføringsapplikator settes over gelen.

5 µl standard påsettes i første brønn.

Før påsetting kokes prøvene på 95°C i 2 min. Deretter blandes prøve og Laemmeli buffer (Tabell 2.7) i forholdet 1:1, hvis dette ikke allerede er gjort.

15 µl prøve påsettes i hver brønn.

Prøvene kjøres først gjennom øvre gel på 90 volt i ca 15 minutter.

Deretter kjøres de gjennom nedre gel på 150 volt i ca 1 time- 1,5 timer.

Blotting av gelen

Membran, skrubber og filterpapir våtgjøres i blottebuffer (Tabell 2.8).

Gelen løsnes fra den tykke glassplaten med en plast spatel.

"Stacking gelen" skjæres av og fjernes.

Deretter legges et filterpapir over gelen.

Gelen løsnes fra den tynne glassplaten med en plastspatel og overføres til filterpapiet.

Gelen pakkes på følgende måte:

- Gelholderens svarte side legges ned
- Skrubb
- Filterpapir (som allerede er festet til gelen)
- Gel
- Membran
- Filterpapir
- Skrubb
- Hvit side på gel holderen

Luft mellom gel og membran fjernes vha en plastrulle, som rulles ut fra midten på membranen.

Gelholderen settes i blottekammeret.

En magnetrører legges i blottekammeret.

En iskassett settes i kammeret.

Kammeret fylles med blottebuffer til det dekker kassetten og gelen.

Blotteoppsatsen settes på kjølerom og kjøres på 50 mA over natt eller 200 mA i to timer.

Farging av membranen

Membranen farges i Ponceaus fargeløsning i 1 min. Det kontrolleres at proteinbåndene farges og at de er jevnt applisert.

Membranen vaskes i PBS og deretter i autoklavert MQ vann.

Blokkering

Membranen legges i et 50 ml rør med protein siden inn mot hulrommet i røret.

Røret tilsettes 3 ml 5% tørrmelk i TBS med 0,1% Tween (Tabell 2.8).

Røret legges på rulle i 1 time i romtemperatur.

Primært antistoff

Primærr antistoff tilsettes i røret i 5% tørrmelk i TBS med 0,1% Tween i forholdet 1:200 (Tabell 2.9).

Røret legges på rulle på kjølerom over natt.

Dagen etter vaskes membranen 3 ganger i 15 min med 5ml TBS med 0,1% Tween.

Sekundært antistoff

TBS med 0,1% Tween tilsettes røret.

Sekundært antistoff tilsettes i forholdet 1:5000.

Røret legges på rullebrett i en time i romtemperatur.

Membranen vaskes deretter med 5 ml TBS med 0,1% Tween i 3 ganger 15 min.

Fremkalling

Membranen tas ut av røret og rester av TBS med Tween fjernes.

Membranen legges på en glassplate med proteinene opp.

Super signal West Femto detection reagent kit inneholder to løsninger som blandes 1:1. Alternativt brukes ECL som fremkallingsløsning. Løsningene A og B blandes i forholdet 40:1. Løsningene må være romtemperert før bruk.

1 ml fremkallingsløsning dryppes på fra midten av membranen og las virke i 5 min.

Restene av fremkallingsvæsken fjernes.

Membranen legges i en egnet plastmappe.

Luft fjernes ved å stryke lett mot plastomslaget.

Proteinene fremkalles i fremkallingsmaskin (Chemi Genius² fra Bio Imaging System) med Genesnap som fremkallingsprogram.

Stripping

Hvis man ønsker å påsette primær antistoff av annen type, kan man gjøre en stripping av membranen. Da fjernes alle antistoffer og det vil kun være igjen proteiner som sitter fast i membranen.

Membranen vaskes i TBS med 0,1 % Tween i 15 min.

Membranen inkuberes i Restore Western Blot Stripping Buffer i 15 min.

Membranen vaskes med TBS med 0,1 % Tween i 15 min.

Nytt primærantistoff i 5 % tørrmelk i TBS med 0,1 % Tween tilsettes membranen og denne inkuberes igjen over natt.

Deretter følges samme prosedyre som nevnt over, under sekundært antistoff.

Tabell 2.8 Løsninger til Westernblotting

Løsninger	Innholdsstoffer	Slutt-konsentrasjon	Mengde
Nedre gelbuffer	Triz-Base	1,5 M	18,170 g
	SDS (20%)	0,4 %	2,0 ml
	MQ vann		ad 100 ml
	Justeres til pH 8,8 med HCl/NaOH		
Øvre gelbuffer	Triz-Base	0,5 M	6,06 g
	SDS (20%)	0,4 %	2 ml
	MQ vann		ad 100 ml
	Justeres til pH 6,8 med HCl/NaOH		
Polyakrylamid gel (10%)	MQ vann		1,5 ml
	Nedre gelbuffer		0,9 ml
	Akrylamid (30%)	9,9%	1,2 ml
	APS (10%)	0,05%	18 µl
	TEMED	0,05%	1,8 µl
Polyakrylamid gel (6%)	MQ vann		2,0 ml
	Nedre gelbuffer		0,9 ml
	Akrylamid (30%)	5,8%	0,7 ml
	APS (10%)	0,05%	18 µl
	TEMED	0,1%	2,9 µl
Polyakrylamid stacking gel (4%)	MQ vann		1,2 ml
	Øvre gelbuffer		0,5 ml
	Akrylamid (30%)	4,5%	0,3 ml
	APS (10%)	0,05%	10 µl
	TEMED	0,01%	2,0 µl

Elfobuffer	Triz-Base	25 mM	3,030 g
	Glycine	0,2 M	14,140 g
	SDS (20%)	0,1 %	5 ml
	MQ-vann		ad 1000 ml
	Justeres til pH 8,3 med HCl/NaOH		
Blottebuffer	Triz-Base	25 mM	3,030 g
	Glycine	0,2 M	14,140 g
	Metanol	20 %	200 ml
	MQ-vann		ad 1000 ml
	Justeres til pH 8,3 med HCl/NaOH		
Tris buffered saline (TBS) med 0,1 % Tween	Triz-Base	20 mM	2,420 g
	NaCl	140 mM	8,000 g
	1 M HCl	3,8 M	3,8 ml
	Tween 20	0,1%	1,0 ml
	MQ-vann		ad 1000 ml
Justeres til pH 7,6 HCl/NaOH			

Tabell 2.9 Antistoffer brukt til Westernblotting

Antistoff	Type	Lot.nr	Leverandør
Bad(K-17)	Primær antistoff Polyklonalt antistoff fra kanin	J3106	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA
Bax(N-20)	Primær antistoff Polyklonalt antistoff fra kanin	F1107	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Bcl _{XL} (H-62)	Primær antistoff Polyklonalt antistoff fra kanin	B2107	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Bcl ₂ (N-19)	Primær antistoff Polyklonalt antistoff fra kanin	G0105	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Nur77(M-210)	Primær antistoff Polyklonalt antistoff fra kanin	E1106	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Nur77(C-19)	Primær antistoff Polyklonalt antistoff fra geit	K0805	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Donkey antigoat	Sekundært antistoff IgG koblet HRP antistoff	A1207	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Donkey antirabbit	Sekundært antistoff IgG koblet HRP antistoff	E3106	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

2.6 Ko-immunpresipitering

Dette er en metode for å verifisere protein-protein interaksjoner. Prinsippet baseres på at ønsket kompleks ”fanges” fra f.eks et cellelysat ved å benytte et spesifikt antistoff. Antistoffet immobiliseres deretter ved å bruke protein A eller protein G som er bundet kovalent til sepharose kuler. Etter vasking av kulene elueres antistoff-proteinkomplekset ved f.eks koking. De bundne proteinene kan deretter identifiseres ved Westernblotting (Berggard et al. 2007).

2.6.1 Høsting av celler til ko-immunpresipitering

Cellene ble høstet 2 døgn etter transfektering.

Fremgangsmåte

Medium helles av og resten pipetteres av.

Cellene vaskes 2 ganger med 3 ml iskald PBS (Tabell 2.5).

1 ml PBS tilsettes og cellene skrapes i to retninger og overføres til eppendorfrør.

Cellene spinnes ned ved 2000 rpm (380 x g) i 3 minutter i kald sentrifuge.

Supernatanten pipetteres av og pelleten løses i 300µl immunobuffer med 300mM NaCl (Tabell 2.10).

Løsningen fryses og tines 3 ganger. Løsningen fryses på etanol-tørrebad og tines på vannbad ved 37°.

2.6.2 Utførelse av ko-immunpresipitering

”Preclearing”

De høstede cellene tilsettes 10 µl preimmunt serum fra samme art som antistoffet som skal brukes kommer fra. Deretter tilsettes 25 µl netto proteinA-sepharose fra en 1:1 suspensjon. Dette inkuberes kaldt i bevegelse.

Løsningen spinnes ned ved 13000 rpm (13200 x g) i 2 minutter (Biofuge pico, Heraeus instruments).

Antistoff

Supernatanten beholdes og tilsettes 10 µl aktuelt spesifikt antistoff.

Inkuberes kaldt i bevegelse i 1 time.

20 µl netto proteinA-sepharose tilsettes og inkuberes kaldt i bevegelse i 1 time.

Løsningen spinnes ned ved 16000 x g i 2 minutter.

Antistoffene som ble brukt er de samme som i Westernblotting (Tabell 2.9).

Vasking

Pelleten brukes videre og partiklene vaskes med 300 µl av følgende løsninger:

-1 gang med immunobuffer med 500 mM NaCl

-1 gang med immunobuffer med 300 mM NaCl

-1 gang med immunobuffer uten NaCl.

Mellom hver vasking vortexes blandingen og pelleten løses. Denne spinnes deretter ned igjen.

Partiklene kokes med 100µl Laemmli buffer (Tabell 2.7).

Prøvene fryses ned til senere Westernblotting.

Tabell 2.10 Løsninger til ko-immunpresipitering

Løsning	Innholdsstoffer	Slutt-konsentrasjon	Mengde
Immunbuffer master uten NaCl	BSA	1 mg/ml	10 mg
	Tris (1M, pH 7,5)	50 mM	500 µl
	EDTA (0,5M)	10 mM	200 µl
	Deoxycholate (20%)	1 %	500 µl
	Triton X	1 %	100 µl
	Leupeptin (5 mg/ml)	5 µg/ml	10 µl
	Pepstatin-A (1 mg/ml)	5 µg/ml	50 µl
	PMSF (0,1M)	0,3 mM	30 µl
	Na ₃ VO ₄ (10 mM)	0,1 mM	100 µl
	MQ vann		ad 9 ml

0 mM NaCl immunbuffer	MQ-vann tilsettes masterløsningen til ønsket volum i forholdet 1:9
300 mM NaCl immunbuffer	MQ-vann og 5 M NaCl løsning tilsettes masterløsningen til ønsket volum i forholdet 2:3:45
500 mM NaCl immunbuffer	5M NaCl løsning tilsettes masterløsningen i forholdet 1:9

2.7 Statistikk

Resultatene ble analysert ved hjelp av Sigma Stat versjon 3.0 fra SPSS Inc., Chicago, USA. For å sammenligne gjennomsnitt for to sett med data, ble det brukt t-test. For å sammenligne gjennomsnitt for flere sett med data ble det brukt "one way analysis of variance" (ANOVA). Ved ikke-normalfordelte datasett ble Kruskal-Wallis One way ANOVA on ranks med Dunns metode benyttet. Signifikans er oppgitt med * ($p < 0,05$).

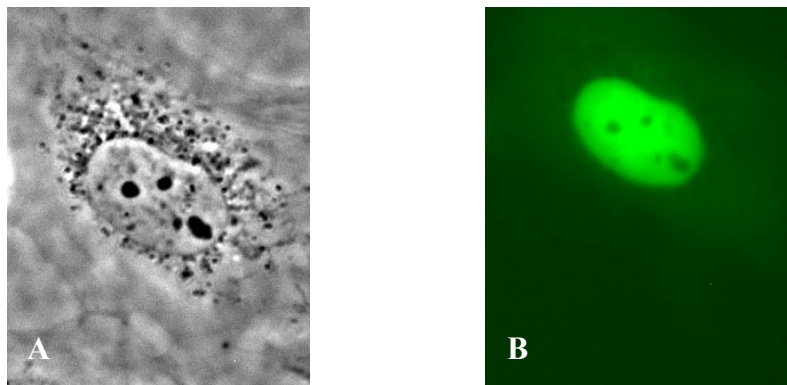
3 Resultater

For å vurdere om NGFI-B interagerer med proteiner i BCL-2-familien ble det valgt å gjøre parallelle forsøk der det ble transfektert søsterskåler med gfp-merket NGFI-B til mikroskopering (3.1) og luciferasemålinger (3.3). Siden aktivisering av reportergenet skjer i kjernen, ble det antatt at en eventuell proteininteraksjon mellom NGFI-B og BCL-2 i cytosol redusere luciferaseaktiviteten. Det ble deretter gjort ko-immunpresipiteringer.

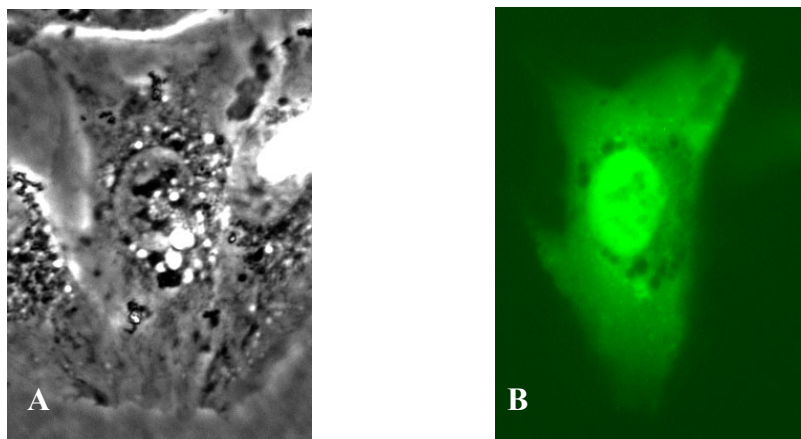
3.1 Mikroskopering

3.1.1 Lokalisering av NGFI-B når ko-transfektet med BCL-2-familien

For å undersøke om NGFI-B intragerer med BCL-2-familiemedlemmer, ble cellene transfektet med NGFI-B-gfp. Det ble undersøkt om kjernelokaliseringen ble redusert ved tilstedeværelse av BCL-2 proteiner. For celler studert i mikroskop ble det brukt samme transfeksjonsprotokoll som for luciferaseforsøkene (3.3) og det ble laget søsterskåler for hvert BCL-2 plasmid (BCL-2, BAX, BCL-X_L og BAD). Cellene ble transfektet med de ulike BCL-2 plasmidene sammen med NGFI-B-gfp, NBRE-luc og rl-CMV. Cellene ble studert i Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop med 40x objektiv, 2 døgn etter transfeksjon. Det ble gjort et forsøk på å vurdere NGFI-Bs lokalisering i cellen ut fra hvor det meste av den fluorescerende grønnfargen befant seg. Intensiteten av grønnfargen i kjerne og cytosol ble målt ved hjelp av bildebehandlingsprogrammet ImageJ. Den grønne fargen befant seg i stor grad i kjernen og det var vanskelig å vurdere hvor grensen for cytoplasma gikk (Figur 3.1). Det var svært få celler som egnet seg for denne type analysering (hadde nok cytoplasmafarge) og det ville da ikke ha blitt et tilfeldig utvalg av cellepopulasjonen som hadde blitt analysert (Figur 3.2). Det var derfor vanskelig å vurdere om de forskjellige BCL-2 proteinene påvirket cellelokalisasjonen til NGFI-B og denne metoden ble derfor ikke brukt videre.

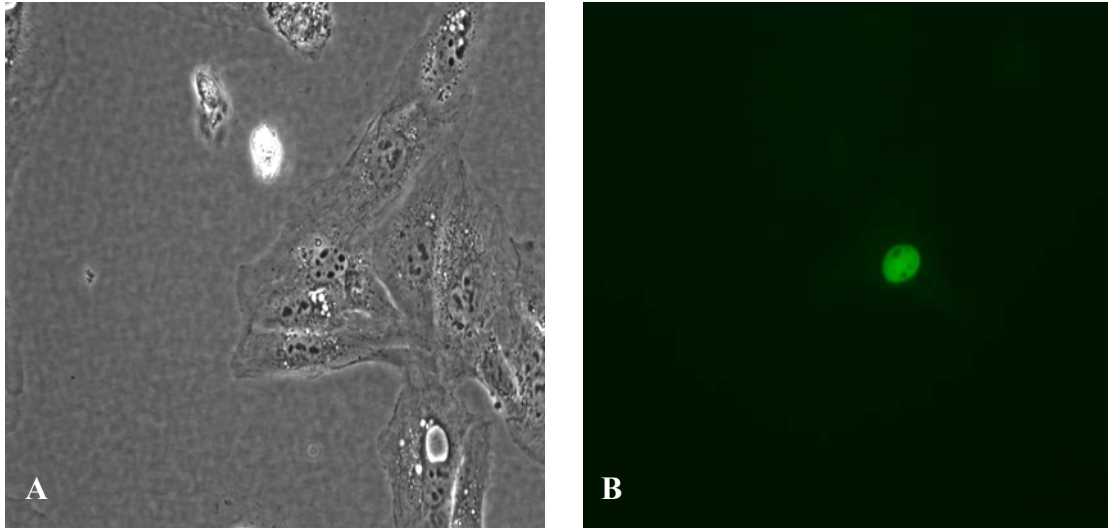


Figur 3.1 Celle transfektert med CMV og NGFIB-gfp. **A** er fasekontrast bilde mens **B** er fluorescence bilde av samme celle. Cellene ble studert i mikroskopet 2 døgn etter transfeksjon. Det er brukt Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop med 40x objektiv for å studere cellene. Bildene er tatt med kamera fra RT Diagnostic Instruments.



Figur 3.2 Celle transfektert med CMV og NGFIB-gfp. **A** er fasekontrast bilde mens **B** er fluorescence bilde av samme celle. Cellene ble studert i mikroskopet 2 døgn etter transfeksjon. Det er brukt Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop med 40x objektiv for å studere cellene. Bildene er tatt med kamera fra RT Diagnostic Instruments.

Cellene ble også brukt til å estimere transfeksjonseffektiviteten (antall transfekterte celler i forhold til det totale celletall). Det så ut til at transfeksjonseffektiviteten var ca. 10% (Figur 3.3).



Figur 3.3 Transfeksjonseffektivitet i CV1-celler.

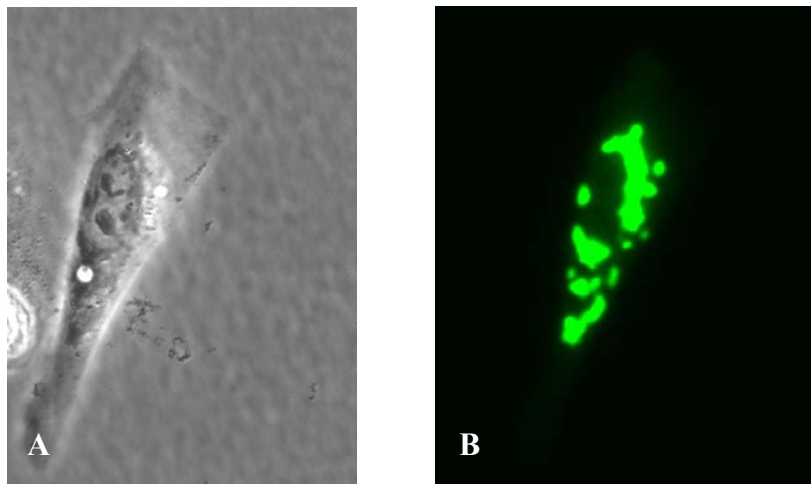
Cellene ble transfektert med NGFI-B-gfp sammen med CMV og etter 2 døgn ble de studert i mikroskop. Det er brukt Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop med 40x objektiv for å studere cellene. Bildene er tatt med kamera fra RT Diagnostic Instruments.

A: Fase-kontrast bilde.

B: Fluorescens bilde.

3.1.2 Lokalisering av BIM i cellen

Siden svært få celler ble grønne ved transfektering med NGFI-B-gfp og BIM_{EL}, ble det gjort et forsøk på å se på lokalisasjonen til BIM. Cellene ble derfor transfektert med BIM-yfp sammen med NGFI-B-wt. Man skulle anta at yfp ville gi gul fluorescens, men fargen går over til grønt og det er grønn fluorescering man hovedsakelig ser. Cellene ble studert i fluorescensmikroskop 2 døgn etter transfektering. Det var også nå svært få celler som var blitt fluorescerende dvs. som var blitt transfektert. De få cellene som var fluorescerende så ut som om de var i ferd med å falle av cellelaget (Figur 3.4).



Figur 3.4 Celle transfektert med BIM-yfp, i ferd med å falle av cellelaget.

Cellene ble transfektert med BIM-yfp og etter 2 døgn ble de studert i fluorescensmikroskop.

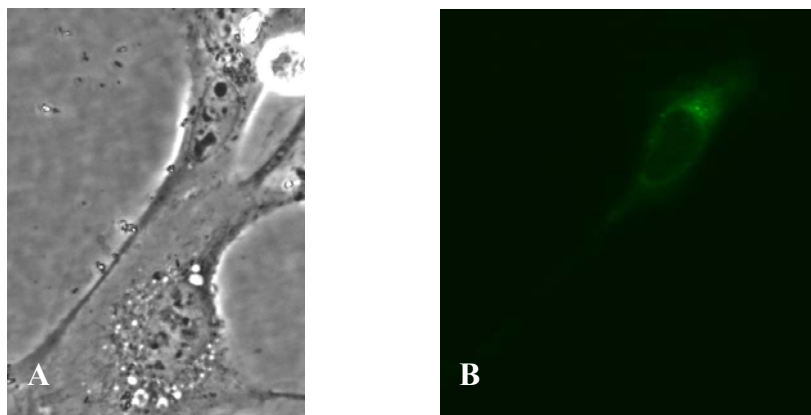
Det er brukt Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop med 40x objektiv for å studere cellene.

Bildene er tatt med kamera fra RT Diagnostic Instruments.

A: Fase-kontrast bilde

B: Fluorescens bilde

Den fluorescerende fargen så ut til å være i cytosol. Det betyr at BIM-yfp proteinet er lokalisert til cytosol og i liten grad til kjernen (Figur 3.5).



Figur 3.5 Lokalisasjonen av BIM-yfp i cellen.

Celler ble transfektert med BIMyfp og etter 2 døgn ble de studert i fluorescensmikroskop.

Det er brukt Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop med 40x objektiv for å studere cellene.

Bildene er tatt med kamera fra RT Diagnostic Instruments.

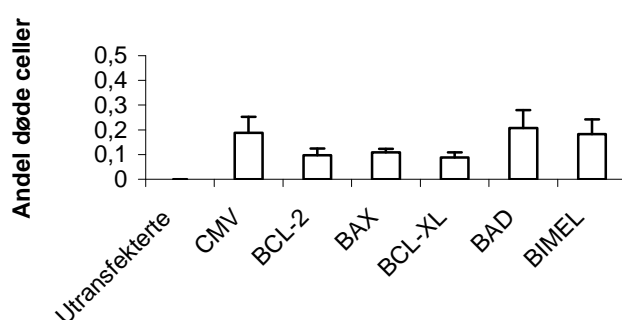
A: Fase-kontrast bilde.

B: Fluorescens bilde.

3.1.3 Celledød

Siden det så ut til at det var få fluorescerende celler ved transfeksjon med BIM_{EL} og BAD (punkt 3.2.1) og BIM-yfp transfekterte celler så ut til å løsne fra cellelaget (Figur 3.4), var det nødvendig å utelukke at cellene ble påvirket negativt og døde av overuttrykkelse av BCL-2 proteinene.

Cellene ble derfor transfektert med de ulike BCL-2 plasmidene. Etter 2 døgn ble cellene farget med FdA og PI og studert i fluorescens-mikroskop. Røde (døde) og grønne (levende) celler ble talt (Figur 3.6).

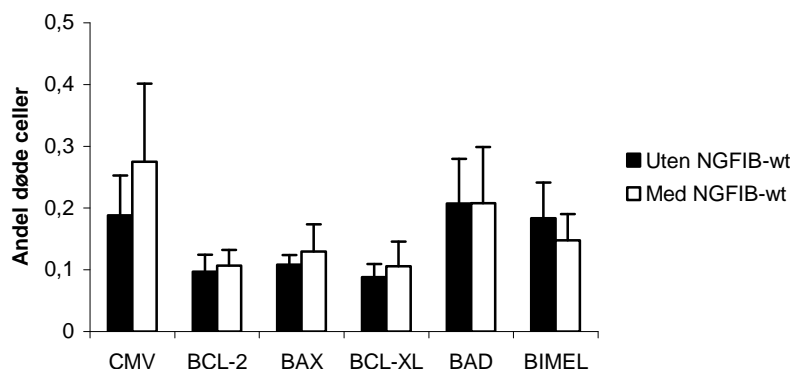


Figur 3.6 Andel døde celler i forhold til antall levende celler.

Celler ble transfektert med BCL-2-familien. Etter 2 døgn ble cellene farget med FDA og PI og antall røde og grønne celler ble talt i fluorescensmikroskop. Søylene viser gjennomsnitt og standard feil av andel døde celler (døde celler/døde+levende celler) (n=3). Statistisk testing viste ingen signifikante forskjeller.

Figur 3.6 viser at det ikke ser ut til at noen av BCL-2 proteinene i seg selv påvirker celledød i noen grad.

Det ble transfektert celler med NGFI-B-wt og de ulike BCL-2 plasmidene for å kunne vurdere om BCL-2-familien sammen med NGFI-B vil kunne gi økt celledød i CV-1 celler (Figur 3.7).

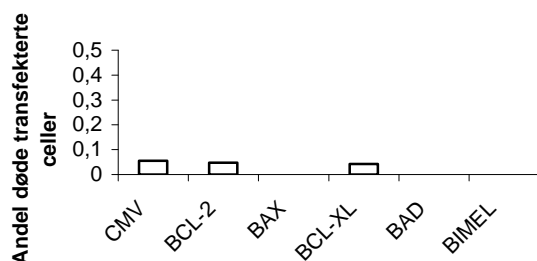


Figur 3.7 Andel døde celler med og uten NGFI-B-wt.

Celler transfektert med BCL-2-familien med og uten NGFI-B-wt. Etter 2 døgn ble cellene farget med FdA og PI og talt i fluorescens-mikroskop. Søylen viser gjennomsnitt og standardfeil av andel døde celler ($n=3$). Statistisk testing viste ingen signifikante forskjeller mellom cellene med og uten NGFI-B eller mellom de ulike BCL-2 proteinene og kontroll (CMV).

Figur 3.7 viser at det ikke er noen store forskjeller på celledødstallene med og uten NGFIB-wt. Dette systemet sier kun noe om den generelle celledøden etter at cellene har blitt utsatt for transfeksjon. På bakgrunn av dette ble det undersøkt om de døde cellene var transfekterte eller om celledøden var tilfeldig spredt mellom transfekterte og ikke transfekterte celler.

Dette ble undersøkt ved å transfektere celler med plasmider fra BCL-2-familien, NGFI-B-wt og Adgfp som ble brukt som en indikator for om cellene har blitt transfektert (Figur 3.8).



Figur 3.8 Andel døde transfekterte celler.

Cellene ble transfektert med NGFI-B-wt, BCL-2-familien og Adgfp som er en markør for om cellene har blitt transfektert. Cellene ble farget med PI farge etter 2 døgn og talt i fluorescens-mikroskop. Søylen viser antall døde transfekterte celler/antallet levende transfekterte+døde transfekterte celler ($n=1$).

Figur 3.8 viser andel døde transfekterte celler. De transfekterte cellene har en celledød på ca. 5% for CMV. Ikke-transfektete celle har en celledød på 20-30%, men med stor variasjon (Figur 3.7). Det ser derfor ut ikke ut til at det er noen høyere celledød i gfp-positive celler i forhold til i hele kulturskålen.

Det er nærliggende å anta at celledøden skyldes effekten transfeksjonsblandingen generelt har på cellene og ikke det at de blir transfektert.

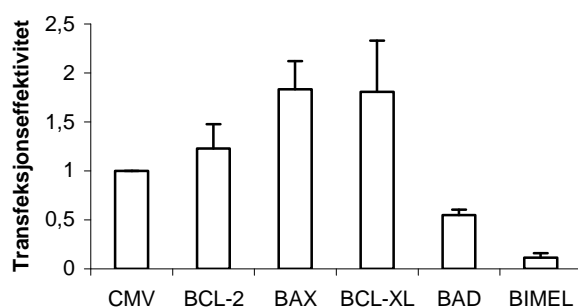
3.2 Kontroller for luciferasemålinger

3.2.1 Renillaluciferase (RL)

Man ønsket å bruke reportergenassay for å vurdere om NGFI-B ble holdt tilbake i cytosol av BCL-2 proteinene.

For å verifisere at resultatene ikke er påvirket av transfeksjonseffektiviteten til de ulike plasmidene var det nødvendig å undersøke om de ulike plasmidene hadde lignende transfeksjonseffektivitet som kontroll. Cellene ble transfektert med rl-CMV, som har en sterk promotor og uttrykkes uavhengig av andre transkripsjonsfaktorer. Denne kontrollen forteller hvor godt cellene har blitt transfektert og om det er noen tendens til at plasmidene påvirker transfeksjonen.

Cellene ble transfektert med plasmider fra BCL-2-familien, NGFI-B-gfp, rl-CMV og RSV-luc. En skål med celler ble transfektert med CMV (tomt plasmid) istedenfor et BCL-2 plasmid. Resultatene for BCL-2 proteinene ble vurdert opp mot denne kontrollen. Dette ble gjentatt i alle luciferase- og mikroskop-forsøkene.



Figur 3.9 Renillaluciferase (RL) tall normalisert mot CMV.

Cellelysats fra celler transfektert med NGFI-B-gfp, BCL-2 plasmider, rl-CMV og RSV-luc ble målt i et luminometer 2 dager etter transfeksjon. Søylene viser gjennomsnitt av RLU normalisert mot CMV og standardfeil (n=5).

Figur 3.9 viser at transfeksjonseffektiviteten generelt er god og at plasmidene ikke påvirker denne mekanismen med unntak av BAD og BIM_{EL}. Når det gjelder BAD ser det ut til at denne har halvert transfeksjonseffektivitet i forhold til kontroll (CMV).

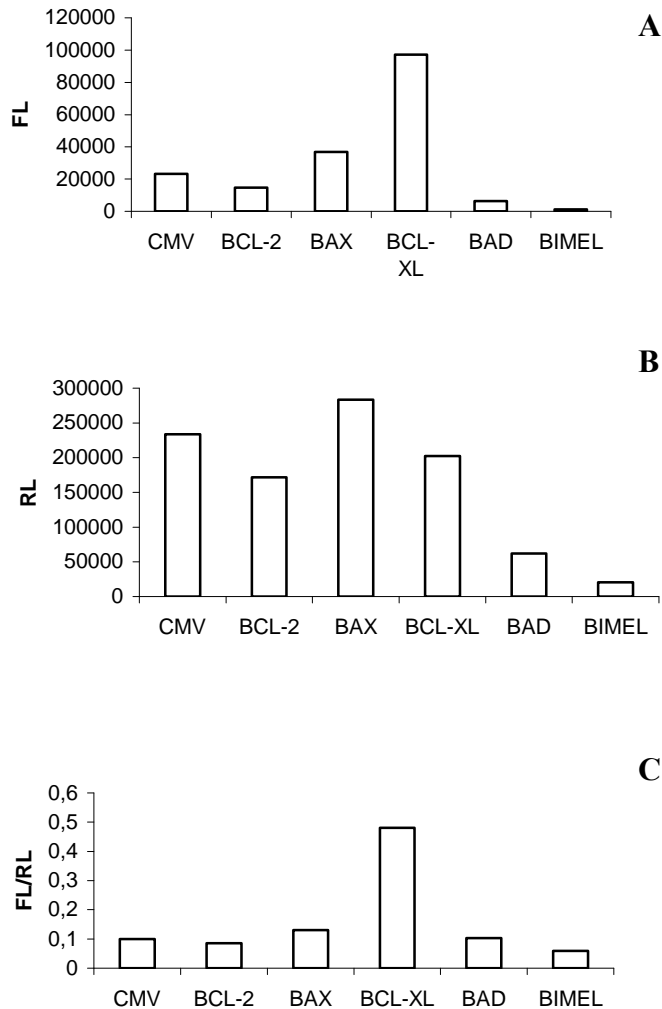
Dette må tas med i vurdering av resultatene ved videre bruk av luciferase som målemetode.

Når det gjelder BIM_{EL} har denne ca. 1/10 av transfeksjonseffektiviteten i forhold til kontroll. Dette vil kunne ha stor betydning ved bruk av luciferase som målemetode.

Parallelle studier i fluorescensmikroskop forsterket dette inntrykket, ved at celler transfektert med NGFI-B-gfp sammen med BIM_{EL} viste svært få/ingen grønne celler samtidig som CMV kontrollen viste god transfeksjonseffektivitet (punkt 3.1.2).

3.2.2 RSV-luciferase

For å se om ildflueluciferase (FL) produksjonen ble påvirket av plasmidene som ble transfektert inn i cellene ble det brukt en sterk promotor, RSV-luc, som ikke er avhengig av andre transkripsjonsfaktorer. Denne erstattet NBRE-luc, som er reportergenet i målemetoden brukt i punkt 3.3. Cellene ble i tillegg transfektert med BCL-2-familien, NGFI-B-gfp og rl-CMV.



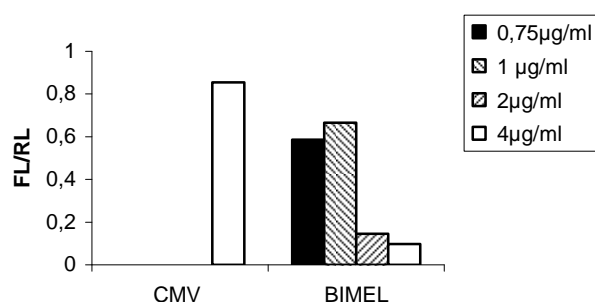
Figur 3.10 Ildflue-luciferase (FL) og renilla-luciferase (RL) uttrykt som RLU(A og B) og forholdet mellom disse (C). Cellelysats fra celler transfektet med RSV-luc (ildflue-luc), BCL-2-familien, NGFI-B-gfp og rl-CMV (renilla-luc). Lysatet ble målt i luminometer 2 døgn etter transfeksjon.

Figur 3.10 viser at BCL-2-familien sammen med NGFI-B-gfp i liten grad påvirker produksjonen av FL med unntak av BCL-X_L. Det ser ut til at forskjeller i FL jevnes ut ved å bruke RL som internstandard for å korrigere for evt. ulik transfeksjonseffektivitet. Dette ser man spesielt godt hos BAD, som ligger relativt lavt i FL verdi, men som etter å ha blitt korrigert med RL verdien, får tilsvarende nivå som de andre BCL-2 proteinene.

Når det gjelder BCL-X_L ser det ut til at dette proteinet påvirker produksjonen av FL. Dette må tas i betraktning når man vurderer senere resultater.

BIM_{EL} ser også ut til å få en mer lik verdi sammenlignet med de andre BCL-2 proteinene, etter å ha blitt korrigert for transfeksjonseffektiviteten (RL). BIM_{EL} har imidlertid så liten transfeksjonseffektivitet og tilsvarende FL produksjon at usikkerheten rundt resultatene blir stor.

Det kan være nærliggende å anta at dette skyldes en konsentrasjonsavhengig effekt, da vi anvender overuttrykte protein. Ved å transfektere med ulike mengder BIM_{EL} plasmid var det mulig å se på denne effekten. Cellene ble transfektert med konsentrasjoner fra 0,75 µg/ml til 4 µg/ml med BIM_{EL}, sammen med NGFI-B-gfp, NBRE-luc og rl-CMV.



Figur 3.11 Effekten av BimEL ved ulike plasmid konsentrasjoner.

Cellelysats fra celler transfektert med ulike rl-CMV, NBRE-luc, NGFI-B-gfp og ulike mengder BIM_{EL}. Lysatet ble målt i luminometer 2 døgn etter transfeksjon.

I Figur 3.11 ser det ut til at fra konsentrasjonen 1 µg/ml til 2 µg/ml går forholdet FL/RL kraftig ned.

De andre BCL-2 proteinene studeres etter at 4 µg/ml plasmid er blitt transfektert og det blir vanskelig å studere BIM_{EL} ved denne konsentrasjonen, da små luciferase verdiene gjør at det blir stor usikkerhet rundt resultatene. BIM_{EL} ble derfor ikke brukt videre.

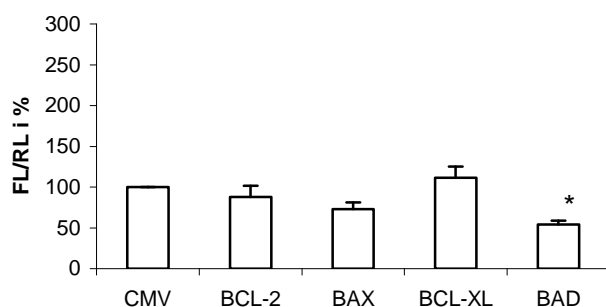
3.3 Luciferase-resultater

3.3.1 Luciferasemålinger med en fast konsentrasjon for BCL-2 plasmidene

Siden RL viser at det er god transfeksjonseffektivitet (Figur 3.9) og RSV-luc kontrollen viser at BCL-2 plasmidene og NGFI-B ikke virker inn på FL produksjonen,

med unntak av BCL-X_L (Figur 3.10), kan metoden brukes til å se på interaksjonen mellom NGFI-B og BCL-2 proteinene.

Cellene ble derfor transfektert med plasmider fra BCL-2-familien sammen med NGFI-B-gfp, NBRE-luc og rl-CMV. 2 døgn etter transfeksjon ble cellene høstet og lysatet ble målt i luminometer. Ved en eventuell interaksjon mellom NGFI-B og BCL-2 forventes en reduksjon i luciferaseaktiviteten.



Figur 3.12 Forholdet mellom FL og RL normalisert mot CMV i prosent.

Cellelysat fra celler transfektert med NGFI-B-gfp, BCL-2-familien, rl-CMV og NBRE-luc ble målt i luminometer. Søylene viser gjennomsnitt og standardfeil (n=8-9). En uteliggende verdi som var 3 SD utenfor ble eliminert fra BCL-X_L gruppen.

Det har tidligere blitt vist at BCL-2 interagerer med NGFI-B. Dette er derfor en positiv kontroll. I Figur 3.12 ser det ut til at BCL-2 gir en lavere luciferaseverdi enn det kontrollen viser, men dette er ikke et signifikant resultat. BAX ser også ut til å gi en sterkere reduksjon i luciferasetall enn det kontrollen og BCL-2 viser. Det ser ut til at BAD gir den største reduksjonen av BCL-2 plasmidene som er målt i Figur 3.12. Dette er også et signifikant resultat i forhold til kontrollen. BCL-X_L ser ikke ut til å gi noen reduksjon i luciferaseverdien, men muligens en liten økning. Det er tidligere vist at BCL-X_L ikke interagerer med NGFI-B (Luciano et al. 2007).

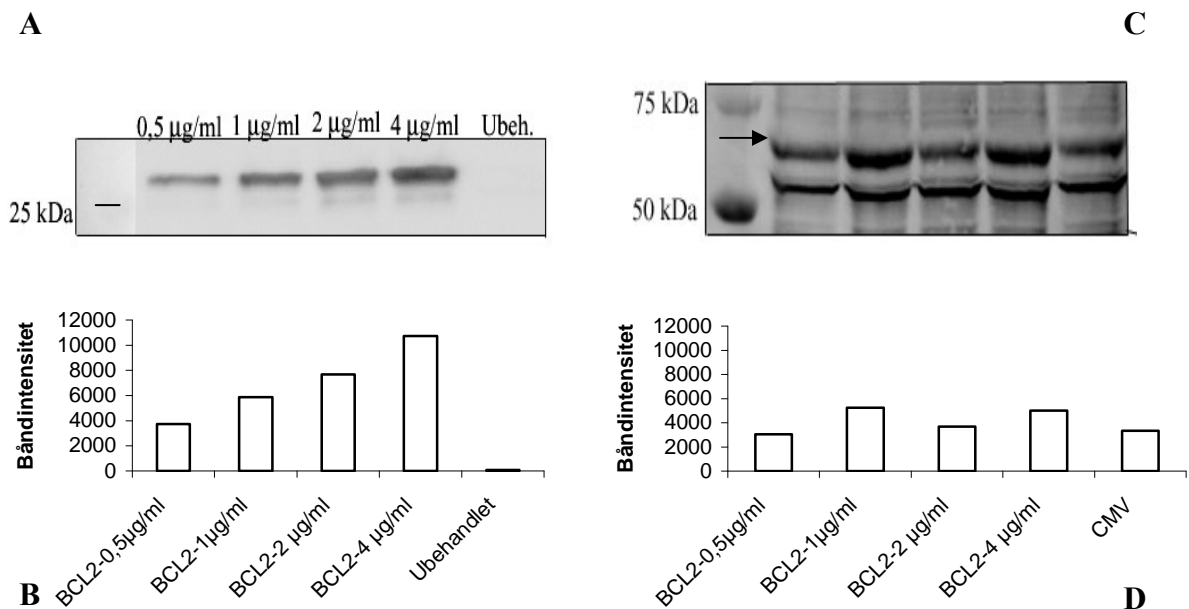
3.3.2 Luciferasemålinger med graderte konsentrasjoner av BCL-2 plasmidene

Siden Figur 3.13 viste en mulig interaksjon mellom NGFI-B og BAX og BAD ble det gjort ytterligere studier for å verifisere dette. I en tidligere studie ble økende mengder BCL-2 plasmid transfektert sammen med en konstant mengde Nur77(NGFI-B), for å

se om dette ga tilsvarende variasjon i de målte resultatene (% apoptotiske celler) (Luciano et al. 2007). Dette ble overført til vårt metodeoppsett.

I forbindelse med dette metodeoppsettet var det viktig å se om man ved å overuttrykke BCL-2 proteinet ville nå et metningspunkt for proteinproduksjonen. Det var også mulig at et overuttrykk av BCL-2 proteinet ville påvirke proteinproduksjonen av NGFI-B.

Cellene ble derfor transfektert med 4 ulike plasmidkonsentrasjoner for BCL-2 plasmidet, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml og 4 µg/ml og en konstant mengde NGFI-B-wt plasmid. Cellene ble som tidligere høstet etter 2 døgn og det ble deretter utført Western blotting. Westernbåndene ble analysert i ImageJ for å se på om det var noen forskjell i intensitet.



Figur 3.13 Cellene ble transfektert med ulike konsentrasjoner BCL-2 plasmider sammen med en konstant mengde NGFI-B-wt. Det ble deretter gjort Westernblotting.

A: Westernbånd for BCL-2 proteinet med stigende konsentrasjoner transfektert plasmid fra venstre til høyre og ubehandlede celler lengst til høyre.

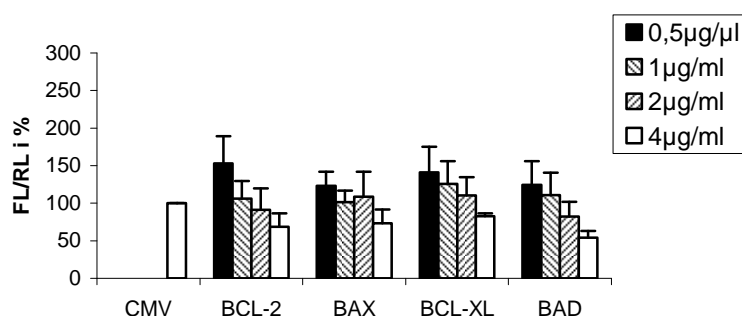
B: Båndintensiteten til de ulike BCL-2 båndene beregnet ved bruk av bildeanalyseprogrammet ImageJ.

C: Westernbånd for NGFI-B der bånd nr 1, 2, 3 og 4 tilsvarende prøvebrønn 1, 2, 3 og 4 i A. Båndet lengst til høyre er positiv kontroll og er lysat fra celler som kun ble transfektert med NGFI-B og CMV.

D: Båndintensiteten til de ulike båndene sett i C. Intensiteten ble beregnet ved bruk av bildeanalyseprogrammet ImageJ.

Figur 3.13 viser at man har en jevn økning i båndintensitet for BCL-2 ved å transfektere med gradvis høyere plasmid konsentrasjon. NGFI-B båndene holder seg relativt konstant i intensitet. Ut fra dette ser det ut til at proteinproduksjonen ikke overmettes og NGFI-B proteinproduksjonen påvirkes i liten grad. Dette kan bety at det samme gjelder for de andre BCL-2 proteinene, men optimalt sett bør det gjøres samme forsøk for BAX, BCL-X_L og BAD.

På bakgrunn av denne kontrollen ble det gjort konsentrasjonsgraderte transfekteringer for BCL-2 plasmidene. Cellene ble transfektert med ulike konsentrasjoner av BCL-2 plasmidene, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml og 4 µg/ml, sammen med NGFI-B-gfp, NBRE-luc og rl-CMV. Som tidligere ble cellene høstet etter 2 døgn og lysatet målt i luminometer (Figur 3.14). Alle BCL-2 proteinene ga en doseavhengig reduksjon i luciferaseverdiene.



Figur 3.14 Sammenheng mellom stigende konsentrasjoner av BCL-2 plasmidene sammen med konstant mengde NGFI-B-gfp og respons målt som FL/RL luc i %.

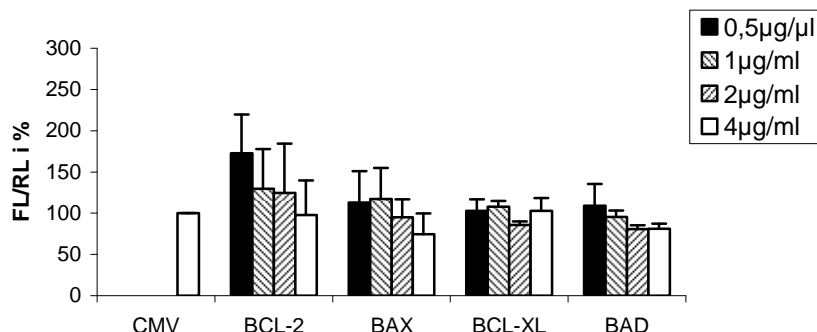
Cellelysat fra celler transfektert med stigende konsentrasjoner av BCL-2 plasmidene, konstant mengde NGFI-B-gfp, NBRE-luc og rl-CMV. Lysatene ble målt i luminometer 2 døgn etter transfeksjon.

Søylene viser gjennomsnitt og standardfeil (n=4). Tallene er normalisert mot CMV.

Statistisk testing mot kontroll (CMV) og innad i konsentrasjonsrekken (0,5 µg/ml - 4 µg/ml) var ikke signifikant.

For å kunne sammenligne luciferaseresultatene med undersøkelser i mikroskop ble det brukt NGFI-B-gfp. Dette proteinet trenger ikke ha de samme egenskapene som et villtype protein uten gfp. Det var derfor viktig å se om transfeksjon med NGFI-B-wt ga de samme resultatene som ved transfeksjon med NGFI-B-gfp. Overnevnte transfekteringsprotokoll ble derfor gjentatt, men NGFI-B-gfp ble erstattet med NGFI-B-wt (Figur 3.15).

BCL-2 (positiv kontroll) ga en doseavhengig reduksjon, mens BCL-X_L ikke reduserte luciferasetallene. Både BAX og BAD viste en tendens til doseavhengig reduksjon av luciferasetallene.



Figur 3.15 Sammenhengen mellom stigende konsentrasjoner av BCL-2 plasmidene sammen med konstant konsentrasjon av NGFI-B-wt og respons målt som FL/RL luc i %.

Cellelysate fra celler transfektert med stigende konsentrasjoner av BCL-2 plasmidene, konstant mengde NGFI-B-wt, NBRE-luc og rl-CMV. Lysatene ble målt i luminometer 2 døgn etter transfeksjon.

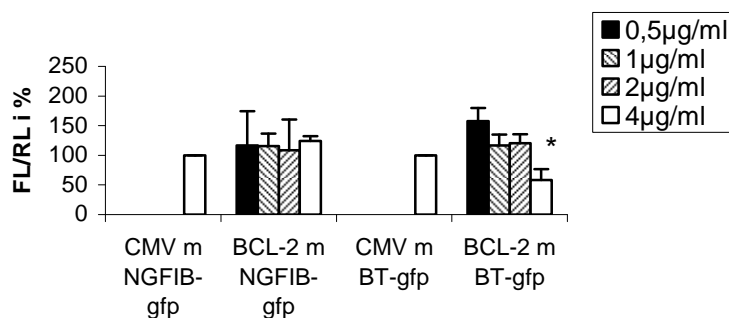
Søylene viser gjennomsnitt og standardfeil (n=3-4). Tallene er normalisert mot CMV.

Statistisk testing mot kontroll (CMV) og innad i konsentrasjonsrekken (0,5 µg/ml-4 µg/ml) var ikke signifikant.

3.4 Graderte konsentrasjoner av BCL-2 plasmidet og mutanter av NGFI-B

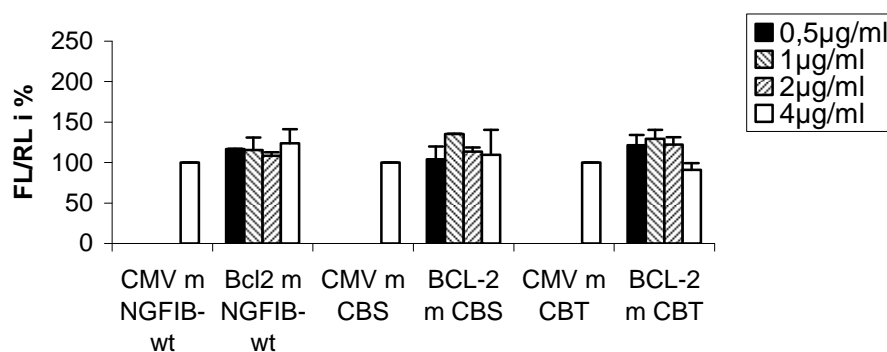
For å kunne vurdere interaksjoner mellom NGFI-B og BCL-2-familien er det nyttig å se hvordan ulike mutanter av NGFI-B kan påvirke lokalisasjon og eventuell proteinbinding. Det ble derfor testet ut ulike mutanter, der de forskjellige fosforyleringssetene til NGFI-B var erstattet med alanin slik at proteinet ikke kunne fosforyleres. Mutantene som ble brukt var: CBS (S₁₃₉A), CBT (T₁₄₂A), BT-gfp (T₁₄₂A), Nur350A (S₃₅₀A).

Ulike konsentrasjoner av BCL-2 plasmidet 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml og 4 µg/ml ble transfektert inn i cellene sammen med en konstant konsentrasjon av de ulike NGFI-B mutantene (BT-gfp, CBS, CBT, Nur350A) eller en av kontrollene NGFI-B-gfp, NGFI-B-wt og Nur77-wt. I tillegg ble cellene transfektert med NBRE-luc og rl-CMV (Figur 3.16-Figur 3.18). Cellene ble høstet for luciferasemålinger 2 døgn etter transfektering og målt i luminometer. Nur77 (mus) ble brukt da S₃₅₀A-mutanten bare var tilgjengelig i Nur77-sekvensen.



Figur 3.16 Sammenhengen mellom stigende konsentrasjoner av BCL-2 plasmidet sammen med konstant mengde NGFI-B-gfp/BT-gfp og respons målt som FL/RL i %. Cellene ble transfektert med stigende konsentrasjoner av BCL-2 sammen med konstant mengde NGFI-B-gfp/BT-gfp, NBRE-luc og rl-CMV. Cellene ble høstet 2 døgn etter transfeksjon og lysatet ble målt i luminometer. Søylen viser gjennomsnitt og standardfeil (n=2-3). Tallene er normalisert mot CMV.

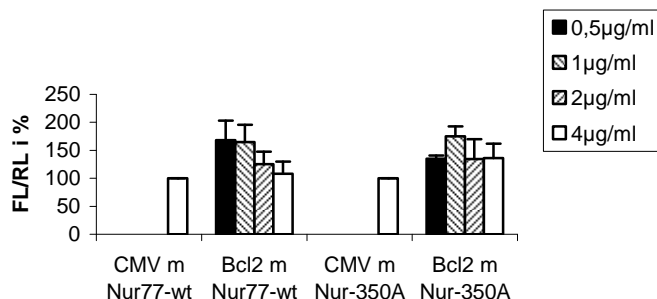
Figur 3.16 viser ingen tendens til nedgang i luciferasetallene for NGFI-B-gfp, mens BT-gfp viser en signifikant doseavhengig reduksjon i luciferasetallene. NGFI-B-gfp og BCL-2 er positiv kontroll som nevnt i 3.3.1 og burde også gitt en doseavhengig reduksjon i luciferasetallene som vist i Figur 3.14.



Figur 3.17 Sammenhengen mellom stigende konsentrasjoner av BCL-2 plasmidet sammen med konstant mengde NGFI-B-wt/CBS/CBT og respons målt som FL/RL i %. Cellene ble transfektert med stigende konsentrasjoner av BCL-2 sammen med konstant mengde NGFI-B-wt/CBS/CBT, NBRE-luc og rl-CMV. Cellene ble høstet 2 døgn etter transfeksjon og lysatet ble målt i luminometer. Søylen viser gjennomsnitt og standardfeil (n=2-3). Tallene er normalisert mot CMV. Statistisk testing ga ingen signifikante forskjeller.

Figur 3.17 viser ingen forskjell i luciferasetall for ulike konsentrasjoner av BCL-2 når transfektert med NGFI-B-wt eller sammen med CBS. NGFI-B er kjent å gi en interaksjon med BCL-2 og burde derfor ha gitt en doseavhengig reduksjon i

luciferasetall som vist i Figur 3.15. CBT ser ut til å ha en større tendens til reduksjon i luciferasetall, enn kontrollen NGFI-B-wt og CBS.



Figur 3.18 Sammenhengen mellom stigende konsentrasjoner av BCL-2 plasmidet sammen med konstant mengde Nur77-wt/Nur-350A og respons målt som FL/RL i %. Cellene ble transfektert med stigende konsentrasjoner av BCL-2 sammen med konstant mengde Nur77-wt/Nur-350A, NBRE-luc og rl-CMV. Cellene ble høstet 2 døgn etter transfeksjon og lysatet ble målt i luminometer. Søylen viser gjennomsnitt og standardfeil (n=2-3). Tallene er normalisert mot CMV. Statistisk testing ga ingen signifikante resultater.

Figur 3.18 viser en doseavhengig reduksjon i luciferasetallene for kontrollen Nur77-wt mens denne reduksjonen ikke er tilstede for Nur-350A.

For de ulike mutantene og deres kontroller er antallet paralleller lavt. Dessuten er det ikke tydelig at NGFI-B-gfp og NGFI-B-wt har en doseavhengig reduksjon som vist tidligere. Forsøkene bør derfor gjentas flere ganger.

3.5 Ko-immunpresipitering

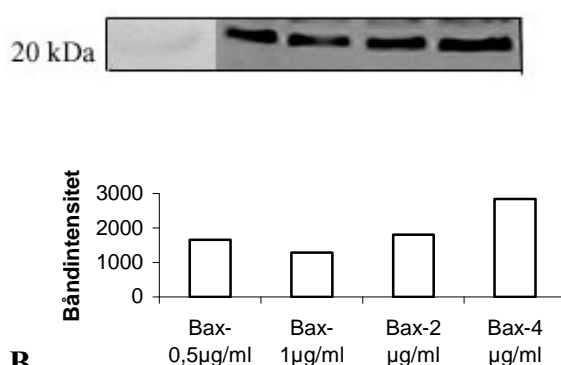
Siden BAD og BAX ga nedgang i luciferasetallene var det nærliggende å anta at det var en interaksjon mellom BAD og NGFI-B og BAX og NGFI-B (Figur 3.14 og Figur 3.15).

Det ble derfor benyttet en bekreftende metode, ko-immunpresipitering, som er en vanlig metode brukt for å påvise protein-protein interaksjoner (2.6). Det var imidlertid nødvendig å optimalisere metoden for proteinene i vårt system.

3.5.1 Westernblotting

Det ble tatt i bruk nye primærantistoffer mot BAX, BCL-X_L, BAD og NGFI-B. Det ble derfor transfektert med de ulike BCL-2 plasmidene i stigende konsentrasjon sammen med NGFI-B-wt og etter 2 døgn ble cellene høstet for Westernblotting. De nye primærantistoffene ble testet ut for å se om de ga bånd på riktig størrelse og for å se om båndintensiteten korrelerte med mengde plasmid transfektert, som vist for BCL-2 i Figur 3.13.

A



Figur 3.19 Westernbånd for BAX (A) og båndintensitet (B). Cellene ble transfektert med 4 ulike konsentrasjoner BAX plasmid 0,5µg/ml, 1µg/ml, 2µg/ml og 4µg/ml sammen med en fast konsentrasjon av NGFIB-wt. Etter to døgn ble cellene høstet for Westernblotting. Det nye primærantistoffet mot BAX ble brukt.



Figur 3.20 Westernbånd for BAD.

Cellene ble transfektert med 4 ulike konsentrasjoner av BAD plasmid 0,5µg/ml, 1µg/ml, 2µg/ml og 4µg/ml sammen med en fast konsentrasjon av NGFI-B-wt. Etter 2 døgn ble cellene høstet for Westernblotting. Det nye primærantistoffet mot BAD ble brukt.

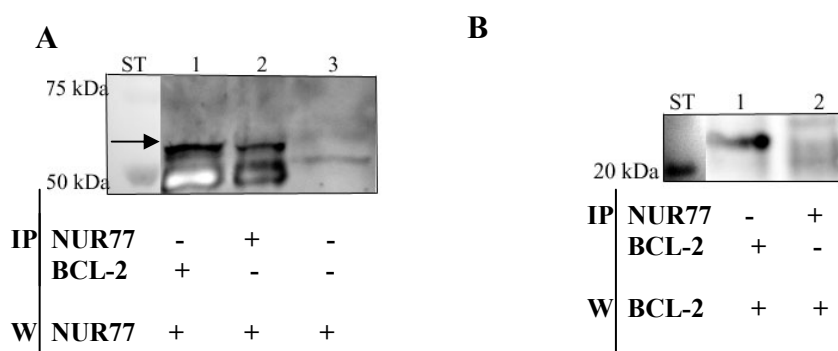
Westernbånd for BAX og BAD er vist i Figur 3.19 og Figur 3.20. Båndintensitet er vist for BAX (Figur 3.19 B) og denne ser ut til å være stigende med økende mengde transfektert plasmid. Pga. for mye bakgrunn i Westernblottet for BAD var det ikke mulig å analysere båndintensitet her. Westernbånd for BCL-2 og NGFI-B er vist i Figur 3.13.

3.5.2 Metodeoptimalisering av ko-immunpresipitering

Cellene ble transfektert med BCL-2-familien og NGFIB-wt og to og to skåler med celler ble transfektert med samme plasmid. De ble deretter høstet til ko-immunpresipitering etter 2 døgn. De to lysatene som var identiske ble probet med hvert sitt primærantistoff, det ene lysatet ble probet med primærantistoff mot BCL-2 og det andre lysatet ble probet med primærantistoff mot NGFI-B. Hver av prøvene ble senere avsatt i 2 brønner på to geler for Westernblotting. Hver gel ble probet med hvert sitt primærantistoff, ett mot BCL-2 proteinet og ett mot NGFI-B proteinet for å påvise proteinbåndene.

Prøvene ble først kjørt på en 10 % polyakrylamid gel, men det ble da svært vanskelig å skille IgG båndet fra NGFI-B båndet. Det ble deretter gjort et forsøk på å kjøre prøvene på 6 % polyakrylamid geler for å separere båndene bedre. Da ble det derimot svært vanskelig å se BCL-2-familiebåndene da disse sammen falt med væskefronten.

Det optimale er derfor å separere ut NGFI-B båndet på 6 % gel parallellt med at BCL-2 protein båndene påvises på 10 % polyakrylamidgel. Gelene ble laget uavhengig av hverandre.



Figur 3.21 Westernbånd etter ko-immunpresipitering av cellelysate med BCL-2 og NGFI-B-wt transfekterte celler høstet 2 døgn etter transfektering. IP=Ko-immunpresipitering

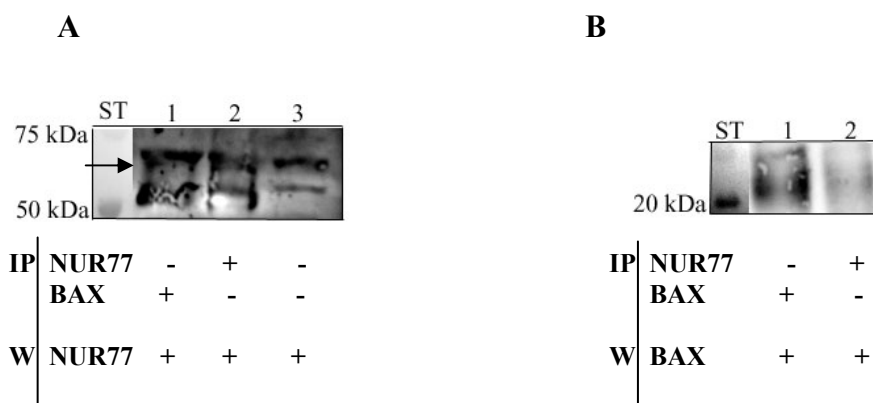
W=Westernblotting ST=Standard. De påfølgende navnene betegner hvilket primærantistoff som har blitt brukt.

A: Bånd 1 og 2 er cellelysate fra søsterskåler, mens 3 er lysate fra celler transfektert med NGFI-B og CMV. Lysatene er kjørt på 6 % polyakrylamidgel.

B: Bånd 1 og 2 er cellelysate fra søsterskåler. Lysatene er kjørt på 10 % polyakrylamidgel.

Gelene ble laget uavhengig av hverandre.

Figur 3.21 viser ko-immunpresipitering av NGFI-B og BCL-2. I A har det blitt detektert NGFI-B bånd i cellelysat 1 og 2 (ko-immunpresipitert med hvert sitt antistoff, henholdsvis BCL-2 og Nur77). Cellelysat 3 viser positiv kontroll for NGFI-B båndet. B viser et tydelig bånd i cellelysat 1, mens det i cellelysat 2 ser ut til at det har skjedd en degradering av proteinbåndet.



Figur 3.22 Westernbånd etter ko-immunpresipitering av cellelysat med BAX og NGFI-B-wt transfekterte celler høstet 2 døgn etter transfektering. IP=Ko-immunpresipitering

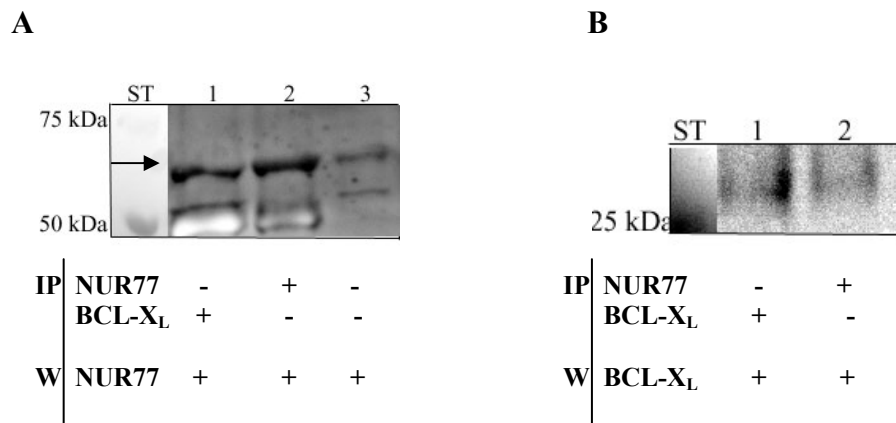
W=Westernblotting ST=Standard. De påfølgende navnene betegner hvilket primærantistoff som har blitt brukt.

A: Bånd 1 og 2 er cellelysat fra søsterskåler, mens 3 er lysat fra celler transfektert med NGFI-B og CMV. Lysatene er kjørt på 6 % polyakrylamidgel.

B: Bånd 1 og 2 er cellelysat fra søsterskåler. Lysatene er kjørt på 10 % polyakrylamidgel.

Gelene ble laget uavhengig av hverandre.

Figur 3.22 viser ko-immunpresipitering av NGFI-B og BAX. A viser NGFI-B bånd både i cellelysat 1 og 2 (ko-immunpresipitert med hvert sitt antistoff, henholdsvis BAX og Nur77). Cellelysat 3 viser positiv kontroll for NGFI-B båndet. B viser et bånd i cellelysat 1, men det er vanskelig å vurdere om dette er et bredt bånd eller om det består av flere bånd. Cellelysat 2 er mindre tydelig, men det ser ut til at det også her er et bredt bånd eller flere enkeltstående bånd.



Figur 3.23 Westernbånd etter ko-immunpresipitering av cellelysat med BCL-X_L og NGFI-B-wt transfekterte celler høstet 2 døgn etter transfektering. IP=Ko-immunpresipitering

W=Westernblotting ST=Standard. De påfølgende navnene betegner hvilket primærantistoff som har blitt brukt.

A: Bånd 1 og 2 er cellelysat fra søsterskåler, mens 3 er lysat fra celler transfektert med NGFI-B og CMV. Lysatene er kjørt på 6 % polyakrylamidgel.

B: Bånd 1 og 2 er cellelysat fra søsterskåler. Lysatene er kjørt på 10 % polyakrylamidgel.

Gelene ble laget uavhengig av hverandre.

Figur 3.23 viser ko-immunpresipitering av NGFI-B og BCL-X_L. A viser tydelige NGFI-B bånd i både cellelysat 1 og 2 (ko-immunpresipitert med henholdsvis BCL-X_L antistoff og Nur77 antistoff). Cellelysat 3 viser positiv kontroll for NGFI-B båndet. I B ser det også ut til å være bånd både i cellelysat 1 og 2. Disse båndene ser ut til å være degraderte eller veldig brede.

4 Diskusjon

4.1 Diskusjon av metoder

4.1.1 CV-1 celler

CV-1 celler transfekteres lett og vokser i konfluente monolag på glass og plast underlag. De er store celler med tydelige cellekjerne og egner seg derfor for mikroskopiske studier. Den eneste kjente måten å indusere caspase-3-aktivering og apoptose i CV-1 celler er ved bruk av cytosin arabinosid (Ara-C) (Manakova et al. 2003). Cellene er derfor robuste og er følgelig egnet til å studere apoptotiske proteiner uten at cellene dør.

For å kunne stadfeste eventuelle funn i forhold til f.eks. nevrodegenerative sykdommer, må forsøkene gjentas i egnede celletyper f.eks. korncellenevrone fra lillehjerne i rotte (Jacobs et al. 2006) eller en annen cellelinje f.eks. PC12 celler som er feokromocytom celler (Katagiri et al. 2000). Forsøkene i CV-1 cellelinjen kan brukes for å optimalisere metoder og for å få en indikasjon på hvilke systemer som er verdt å studere videre i andre celletyper.

4.1.2 Mikroskopering

Metoden var tenkt å brukes for å sammenligne lokalisasjonen av NGFI-B i cellene sett i mikroskop med luciferasemålingene. Ved en optimal distribusjon av NGFI-B-gfp er det interessant å se på eventuell endret lokalisasjon av NGFI-B sammen med de ulike BCL-2 proteinene. Hvis NGFI-B lokalisasjonen endrer seg ved ko-transfektering med ulike BCL-2 proteiner, kan man tenke seg at det er en interaksjon tilstede.

For å studere lokalisasjonene av NGFI-B i fluorescensmikroskop, ble cellene transfektert med en merket variant av NGFI-B sammen med de ulike BCL-2 proteinene, BAX, BCL-X_L, BAD og BIM_{EL}. 2 døgn etter transfekteringen ble cellene studert i fluorescensmikroskop. Lokalisasjonen av NGFI-B sammen med BCL-2-familien ble sammenlignet med kontrollen som ble transfektert med tomt plasmid og NGFI-B-gfp. I mange av cellene i kontrollen så det ut til at NGFI-B-gfp alene befant seg mest i kjernen (Figur 3.1). Noen få celler hadde jevn distribusjon av NGFI-B i hele cellen. Det er tidligere vist at NGFI-B-gfp i ubehandlede CV-1 celler fordeler seg jevnt i hele cellen (Jacobs et al. 2004). Dette er også tilfellet i andre celletyper (Moll

et al. 2006). Hva som er årsaken til at NGFI-B i så stor grad lokaliseres til cellekjernen kan skyldes ulike variabler ved transfektering. Ulike batcher med føtalt kalve serum som brukes i vekstmediet kan inneholde ulike mengder vekstfaktorer som kan gi kjerneimport av NGFI-B. Alternativt kan det ha gått for kort tid til at det har oppstått likevekt mellom kjerneimport/kjerneeksport av NGFI-B. En mulighet for å få en jevnere distribusjon av NGFI-B, kan være å bytte serum.

Det var ikke mulig å se noen umiddelbar endring i NGFI-Bs lokalisasjon ved ko-transfektering med de ulike BCL-2 plasmidene og det var vanskelig å finne celler som hadde tydelig cytoplasmalokalisasjon av NGFI-B. Det ble derfor vanskelig å måle opp cellenes avgrensning for å kvantifisere forholdet mellom NGFI-B i kjernen og i cytoplasma. Dersom en hadde valgt celler med NGFI-B-gfp i cytoplasma, ville det ha blitt et selektivt utvalg av celler. På bakgrunn av dette ble denne metoden ikke brukt videre.

En annen måte å studere protein-protein interaksjoner på er ved bruk av ko-immunpresipiteringer (4.1.4). En annen metode som kan brukes i cellekultur er Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Da benyttes to fluorofores molekyler merket på hvert sitt protein, der emisjons spekteret til donor molekylet overlapper eksitasjonsspekteret for mottagermolekylet. Når de to proteinene ikke er i nærheten av hverandre, fører eksitasjon av donorfluoroforen til donoremisjon. Når de to proteinene er svært nær hverandre (f.eks) i et proteinkompleks, vil donoreksitasjon føre til mottageremisjon. Fluoroforene som kan brukes *in vitro* er ”cyan fluorescent protein” (cfp) og ”yellow fluorescent protein” (yfp) (Lopper and Keck 2007). FRET kan også brukes til *in vitro* studier av protein-protein interaksjoner og dette har blitt gjort i en studie av dimerisering hos BCL-2-familieproteiner (Whitfield et al. 2003).

4.1.3 Luciferasemetoden

For å kunne vurdere om luciferasemetoden var en aktuell metode for å undersøke interaksjoner mellom NGFI-B og BCL-2-familien, var det viktig å vurdere de ulike variablene som kunnen påvirke metoden. Aktuelle faktorer som kan spille inn er variasjonene i transfeksjonseffektivitet, celletettheten, overlevelse og cellelysering. En mye brukt måte å eliminere disse forskjellene er å transfekte cellene med renilla-luciferase. Plasmidet har en sterk promotor koblet til genet for renillaluciferase, som i

teorien ikke skal påvirkes av de nevnte variablene man har fra forsøk til forsøk. Det er vist at renillaluciferase plasmider ble påvirket ved ko-transfeksjon med nur77 familie proteiner (Nur77, NURR1 og NOR-1) i PC12 celler (Matuszyk et al. 2002). Man så da at man fikk en økning i renillaluciferase aktivitet. Det fins ulike kommersielle reportervektorer som inneholder syntetisk luciferase. Promotoren som lå oppstrøms for renillaluciferase-enzymet var i dette tilfellet HSV-TK (herpes simplex virus thymidin kinase) promotor regionen (Matuszyk et al. 2002). I systemet vårt er det brukt rl-CMV (RL). Resultater fra tidligere forsøk har vist at NGFI-B ikke påvirker rl-CMV (Personlig meddelelse, Ragnhild Paulsen).

I Figur 3.9 ser det ut til at BAX, BCL-X_L og til en viss grad BCL-2 har bedre transfeksjonseffektivitet enn kontrollen (CMV) og BAD. Hvis det ikke korrigeres med en internstandard vil derfor dette kunne påvirke resultatene. Det ble valgt å bruke rl-CMV som internstandard, da det så ut til at det var visse forskjeller i transfeksjonseffektivitet eller andre påvirkende faktorer (rl varierte fra forsøk til forsøk og fra plasmid til plasmid). Mengden rl-CMV plasmid som ble transfektert inn i cellene ble holdt så lav som mulig, for å unngå å overstige cellenes proteinproduksjonskapasitet og for ikke å komme utenfor det lineære området for målemetoden.

Celler ble transfektert med RSV-luciferase (FL) sammen med BCL-2 plasmidene, NGFIB-gfp og rl-CMV for å se om det var noen påvirkning av ildflueluciferase produksjonen. RSV-luciferase har en sterk promotor, slik at den ikke trenger andre transkripsjonsfaktorer. Figur 3.10 C viser at etter korreksjon med RL, ser det ut til at det er liten variasjon mellom kontrollen (CMV + NGFI-B) og BCL-2 plasmidene sammen med NGFI-B, med unntak av BCL-X_L. I dette forsøket er det FL (Figur 3.10 A) som gjør at BCL-X_L har en så mye høyere FL/RL verdi enn for de andre BCL-2 plasmidene/CMV. Ut fra dette ser det ut til at BCL-X_L påvirker FL produksjonen. Hva som er årsaken til dette er vanskelig å vurdere, men dette vil ha betydning for BCL-X_L resultatene.

Ved bruk av konsentrasjonsgradient metoden (3.3.2), var det viktig å utelukke at proteinproduksjonskapasiteten i cellene ikke ble oversteget, eller at proteinproduksjonen av et protein gikk på bekostning av produksjonen av et annet

protein. Cellene ble derfor transfektert med stigende konsentrasjoner av BCL-2 plasmidet sammen med en fast konsentrasjon av NGFI-B-wt. Etter Westernblotting ble intensiteten av båndene analysert både for BCL-2 og NGFI-B som vist i Figur 3.13. Her har BCL-2 båndene en økende intensitet med økende plasmid konsentrasjon, mens NGFI-B båndene holder seg relativt konstante. I ubehandlede celler er det ikke detekterbar mengde BCL-2 protein. I en tidligere studie i ubehandlede CV-1 celler er det vist at det er BCL-2 protein tilstede (Manakova et al. 2004). Ved økt eksponeringstid ved framkalling av Westernbåndene var det mulig å se et veldig svakt bånd, men dette var ikke detekterbart ved kortere eksponeringstid (ikke vist). Dette viser at ved transfektering av BCL-2 plasmid får man et overuttrykk av protein i cellen.

NGFI-B kontrollen i Figur 3.13 C viser at det er riktig bånd som har blitt analysert. Dette betyr at opp til 4 µg/ml vil cellene fortsatt ha kapasitet til å produsere BCL-2 protein uten at det går på bekostning av proteinproduksjonen av NGFI-B.

Det er ikke gjort noen kontroll for om det var tilsatt like mye proteinmengde i hver av brønnene. Det kan diskuteres om det burde ha vært gjort en proteinmåling av de ulike prøvene, for å få stadfestet at det ble påført like mye protein til polyakrylamid gelen. Problemet med å måle proteinmengden i hver prøve først er at man da innfører en ny variabel som igjen kan bidra til økt usikkerhet rundt resultatene.

Et bedre alternativ kan være å identifisere et protein som stort sett finnes i konstante mengder i cellene ved å benytte antistoffer mot dette proteinet og se at båndene for alle prøvene har lik intensitet. En studie som er gjort på ulike mulige kontroller for påføringsmengden av protein ved Westernblotting, konkluderer med at glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) egner seg best (Dittmer and Dittmer 2006).

Det er stor sannsynlighet for at kontrollen for BCL-2 proteinproduksjonen også vil gjelde for de andre BCL-2 proteinene. Men denne kontrollen bør gjøres for alle proteinene da det kan tenkes at de andre proteinene vil påvirke proteinproduksjonen. Det ser ut til at BAX også har en jevn økning i proteinmengde med økende mengde transfektert plasmid (Figur 3.19), men man vet ikke hva mengden er i ubehandlede celler. Det er heller ikke undersøkt om konsentrasjonen av NGFI-B påvirkes med økende BAX proteinproduksjon. Dette er det nødvendig å gjøre som kontroll for konsentrasjonsgradientmetoden (3.3.2). Spesielt kunne man tenke seg at BCL-X_L vil

ha en innvirkning på den generelle proteinproduksjonen på samme måte som det påvirket FL produksjonen (3.2.2).

4.1.4 Ko-immunpresipitering

Ko-immunpresipitering er en vanlig metode brukt for å identifisere protein-protein interaksjoner. Teknikken avhenger av at antistoff spesifikt kan identifisere det aktuelle proteinet som del av et proteinkompleks.

Siden noen av antistoffene ble tatt i bruk for første gang, var det viktig å se at disse var spesifikke nok til å identifisere de aktuelle proteinene. Celler ble transfektert med NGFI-B og aktuelt BCL-2 plasmid og etter 2 døgn ble de høstet til Westernblotting. Blottene viste at antistoffene var relativt spesifikke og at det identifiserte proteinet hadde riktig molekylvekt kjent fra litteraturen. BCL-2 ble identifisert som et bånd litt større enn 25 kDa (Figur 3.13) og er i følge litteraturen 26 kDa (Tsujimoto and Croce 1986). BAX ble identifisert som et bånd mellom 20 og 25 kDa (Figur 3.19) og er i følge litteraturen 21 kDa (Oltvai et al. 1993). BAD ble identifisert som et bånd litt mindre enn 25 kDa (Figur 3.19) og er i følge litteraturen 22 kDa (Yang et al. 1995). BCL-X_L ble ikke identifisert ved bruk av Westernblotting. I følge litteraturen er BCL-X_L 29 kDa (Boise et al. 1993), så ved rett valg av antistoff og forsøksbetingelser kan BCL-X_L identifiseres ved bruk av denne metoden.

Et problem som ofte oppstår ved ko-immunpresipitering er interferens fra antistoffet ved gel analyse av presipitatet med aktuelt protein. IgG antistoffet som brukes består av en tung og en lett kjede (50 og 25 kDa i denaturert tilstand). Proteiner som migrerer sammen med antistoff-fragmentene vil bli svært vanskelig å identifisere på Westernblottet (Lopper and Keck 2007).

Dette viste seg å bli et problem i vårt metodeoppsett. Vi ønsket å se på interaksjoner mellom NGFI-B som er 61 kDa (Milbrandt 1988) og BCL-2 proteinen som har størrelser mellom 21 kDa og 29 kDa. Cellene ble transfektert med NGFI-B og et av de 4 BCL-2 plasmidene. De ble høstet for ko-immunpresipitering etter 2 døgn for deretter å bli ko-immunpresipitert. Proteinene i presipitatene ble detektert ved Westernblotting. Ved å bruke 10% polyakrylamid gel fikk vi et svært tykt IgG bånd på ca 50 kDa, som sammenfalt med eventuelle NGFI-B-bånd. Dette skyldes at området mellom 75 kDa og 50 kDa blir for lite til at metoden greier å skille mellom båndene i dette området, spesielt siden IgG båndet er så stort.

Den lette IgG kjeden kan i teorien også forstyrre metoden, siden dette båndet har en størrelse på 25 kDa, som er samme størrelse som BCL-2 proteinene har. Dette har ikke sett ut til å være noe problem på blottene våre.

For å unngå problemene med den tunge kjede til IgG på gel med NGFI-B, ble det forsøkt å separere proteinen i en 6% polyakrylamid gel. Da ble separeringsområdet mellom 50 og 75 kDa større og båndene ble mer spredt og lettere å identifisere. På disse blottene separeres NGFI-B båndet før IgG båndet og disse sees som to distinkte bånd (Figur 3.21.). Problemet med å kjøre presipitatet gjennom en 6% polyakrylamid gel er at proteinbåndene for BCL-2-familien vil sammenfalle med væskefronten, noe som gjør det umulig å identifisere de aktuelle proteinene. Løsningen vil derfor bli å kjøre presipitatet parallellt gjennom to ulike geler, 6% og 10% og få separert ut henholdsvis NGFI-B og BCL-2 på hver sin gel.

En annen mulighet er å benytte kommersielle gradientgeler for å separer NGFI-B og BCL-2 proteinene.

Alternativet for å omgå problemet med IgG båndet er å binde antistoffet til støtte-matriksen (sepharose-kulene), noe som forhindrer at antistoffet separeres gjennom gelen og blottes over på membranen i Westernblotting prosedyren (Lopper and Keck 2007).

I metodeoppsettet i 3.5.2 ble det laget to cellelysat for hvert BCL-2 protein, der et lysat ble ko-immunpresipitert med BCL-2 antistoff og det andre lysatet ble ko-immunpresipitert med antistoff mot NGFI-B. I tillegg burde man ha hatt et lysat der kun NGFI-B eller BCL-2 proteinene var tilstede som også ble behandlet med begge antistoffer. Dette er en kontroll for at det ikke er noen uspesifikk interaksjon mellom antistoffene og antigenene. F.eks skulle man da ikke fått noe NGFI-B-bånd fra et cellelysat med kun NGFI-B, og immunpresipitert med BCL-2 antistoff.

4.2 Diskusjon av resultater

4.2.1 BIM_{EL}

BIM_{EL} er et interessant protein i forbindelse med nevrodegenerative sykdommer.

Proteinet blir induisert i ulike typer nerveceller ved å fjerne NGF og ved K⁺-deprivering i kornceller fra cerebellum (Putchal et al. 2001). Det er vanligvis nøytralisert ved at det er bundet til mikrotubuli (Puthalakath et al. 1999) og i fri tilstand er det svært toksisk for flere celletyper (O'Connor et al. 1998).

De mikroskopiske undersøkelsene av BIM_{EL} ga veldig få transfekterte celler i forhold til kontrollen. Luciferaseforsøkene viste at transfeksjonseffektiviteten var svært lav og FL tallene var tilsvarende lave (Figur 3.9 og Figur 3.10). Dette var resultater etter transfeksjon med 4 µg/ml BIM_{EL} plasmid, som er en relativt høy konsentrasjon.

Denne konsentrasjonen er sannsynligvis så høy at BIM_{EL} vil være cytotoxisk for de fleste av cellene som blir transfektert (se også senere). Dette kan forklarer den tilsynelatende lave transfeksjonseffektiviteten og de lave FL tallene.

Ved transfeksjon av BIM-yfp for å se på lokalisasjonen i cellene, var det også svært få celler som var transfektert og fluorescerende. De få cellene som var tydelig fluorescerende så ut til å være i ferd med å løsne fra cellelaget (Figur 3.4). Dette kan være årsaken til at det tilsynelatende var så få celler som ble transfektert ved transfeksjon av NGFI-B-gfp og BIM_{EL} og påfølgende mikroskopering.

Dette kan også spille inn for luciferaseforsøkene, der cellene vaskes i høstprosedyren. Resultatet kan være at de transfekterte cellene har løsnet og vaskes vekk.

Ut fra konsentrasjonsgradientforsøkene med BIM_{EL} og NGFI-B ser det ut til at det går en grense for BIM_{EL}s toksisitet ved 1 µg/ml plasmidkonsentrasjon. Det kan være nærliggende å tenke seg at dette kan skyldes en metningskinetikk av bindingssetene på mikrotubulikomplekset. Ved høyere konsentrasjoner enn 1 µg/ml vil mikrotubuli ikke lenger greie å binde BIM_{EL}, slik at den overskytende proteinmengden vil kunne lokaliseres til mitokondriene og binde seg til f.eks BCL-2. Dette vil kunne forstyrre balansen mellom de antiapoptotiske og de proapoptotiske BCL-2 proteinene, slik at cellen går inn i apoptose.

Dette er vist ved bruk av stressfaktorer som virker på mikrotubulis stabilitet og som på den måten frigjør BIM og videre induserer apoptose (Tong et al. 2005).

For å studere BIM_{EL} må det ut fra disse funnene benyttes andre teknikker eller andre cellelinjer som ikke dør når BIM_{EL} overuttrykkes. Alternativet er å finne en lav nok konsentrasjon til at cellene ikke dør og samtidig greie å se på eventuelle interaksjoner.

Ved å bruke BIM-yfp var det mulig å se på lokalisasjonen av proteinet i cellene. Figur 3.5 viser at BIM-yfp lokaliseres til cytoplasma og i liten grad til kjernen. Dette kan indikere at BCL-2 proteinenes lokalisasjon først og fremst er i cytoplasma, noe som er normal lokalisasjon. Mikroskoperingsmetoden kan derfor brukes til å se på interaksjoner mellom NGFI-B og BCL-2 proteinene.

4.2.2 BCL-2

Figur 3.12 viser de ulike BCL-2 proteinene når disse er ko-transfektet med NGFI-B-gfp. Verdiene er normalisert mot CMV som er kontroll. Ut fra søylene ser det ut til at BCL-2 kun ligger litt lavere enn CMV og denne forskjellen er ikke stor nok til å være signifikant. Dette skulle tilsi at det ikke var noen interaksjon mellom NGFI-B og BCL-2 eller kun en svak interaksjon, alternativt at metoden ikke fanger opp interaksjonen. Det er tidligere vist at BCL-2 og NGFI-B interagerer slik at BCL-2 omdannes fra en beskytter til en morder (Lin et al. 2004). BCL-2 interaksjonen er derfor en positiv kontroll i systemet vårt. I Figur 3.12 er det ingen tydelig tendens til at NGFI-B interagerer med BCL-2.

Siden det var svært vanskelig å se de store forskjellene mellom de ulike BCL-2 proteinene sammen med NGFI-B, var det nødvendig å finne et nytt metodeoppsett for å tydeliggjøre de eventuelle forskjellene. Det ble derfor valgt å transfektere med ulike konsentrasjoner av BCL-2 plasmidene for å se om de ulike mengdene BCL-2 plasmid ville påvirke lokalisasjonen til NGFI-B og dermed luciferaseverdien. Ved interaksjon burde luciferaseverdien bli høy for lav konsentrasjon av BCL-2 plasmid og lavere ved høyere konsentrasjoner av BCL-2 plasmid. Dette var beskrevet i studien som viste at BCL-X_L ikke interagerer med NGFI-B (Luciano et al. 2007).

I Figur 3.14 ble cellene transfektet med stigende konsentrasjon av BCL-2 plasmid sammen med konstant mengde NGFI-B-gfp. Her ser det ut til at det er en tendens til at forholdet FL/RL reduseres med høyere konsentrasjoner av BCL-2. Dette betyr at jo høyere konsentrasjonen av BCL-2 er desto lavere er produksjonen av FL og dermed transkripsjonen av NBRE-luc. Dette betyr igjen at man kan anta at mengden NGFI-B

som befinner seg i kjernen er lavere ved 4 µg/ml enn ved 0,5 µg/ml BCL-2. BCL-2 påvirker derfor lokalisasjonen av NGFI-B. Det er tidligere vist at BCL-2 interagerer med NGFI-B (Lin et al. 2004). Dette indikerer at modellen vi har brukt, kan brukes til å detektere eventuelle interaksjoner mellom NGFI-B og BCL-2 proteinene.

Sammenlignet med kontrollen gir de lave konsentrasjonene av BCL-2 høyere transkripsjon av NBRE-luc. Westernblottene for BCL-2 og NGFI-B (Figur 3.13) viser at det er like mye NGFI-B tilstede i CMV kontrollen og i prøven med 0,5 µg/ml BCL-2 plasmid. Det er derfor ikke mengden NGFI-B som er årsaken til forskjellen i transkripsjon av NBRE-luc. For å finne grunnen til denne forskjellen kan man mikroskopere cellene for å se om det er mer NGFI-B lokalisert til kjernen med BCL-2 tilstede, sammenlignet med CMV.

NGFI-B plasmidet som har blitt brukt var merket med gfp. Dette er som nevnt tidligere (2.3) en relativt stor hale, som kan påvirke kjerneimporten/eksporten av NGFI-B. For å utelukke at gfp har noen innvirkning på lokalisasjonen av NGFI-B, ble det samme forsøket gjentatt med villtype NGFI-B. Figur 3.15 viser sammenhengen mellom BCL-2 proteinene i økende konsentrasjon og NGFI-B-wt. Tendensen ser ut til å være den samme og det var heller ingen signifikante forskjeller mellom BCL-2+NGFI-B-gfp søylene og BCL-2+NGFI-B-wt søylene når en og en konsentrasjon fra hver av gruppene ble sammenlignet.

For å bekrefte dette ble ko-immunopresipitering brukt. Metoden ble først optimalisert som nevnt i punkt 3.5.2. Deretter ble metoden brukt en gang. Figur 3.21 A ser ut til å vise at et NGFI-B bånd har blitt identifisert både for lysat 1 og 2. På figur B er det et ganske tydelig BCL-2 bånd i lysat 1 mens lysat 2 har et svært utydelig bånd som også ser ut til å være degradert. Ut fra teorien skulle man fått NGFI-B bånd og BCL-2 bånd i begge lysat for å kunne si med sikkerhet at det var en interaksjon til stede. Det er derfor nødvendig gjøre forsøkene flere ganger.

4.2.3 BAX

Det er ikke kjent om BAX interagerer med NGFI-B, men BAX har mange andre dimeriseringspartnere. BAX er vanligvis inaktivert og løst bundet til mitokondriemembranen som en monomer i ikke-apoptotiske celler (Hsu and Youle 1998). Ved et apoptotisk signal vil BAX endre konfigurasjon og translokere til mitokondriene (Hsu et al. 1997). Det er ikke kjent hvordan denne aktiveringen og

translokeringen skjer. Man vet at BCL-2 kan danne heterodimerer med BAX, noe som hemmer apoptose (Oltvai et al. 1993) og også andre proteiner i den antiapoptotiske BCL-2-familien kan dimerisere med BAX (Sedlak et al. 1995). BAX danner også homodimerer med seg selv (Oltvai et al. 1993). Andre dimeriseringspartnere enn BAX selv, som fremmer apoptose er ennå ikke kjent.

I Figur 3.12 ser det ut til at BAX påvirker NGFI-Bs kjernefunksjon i sterkere grad enn det BCL-2 gjør. Dette kan indikere at NGFI-B i større grad er lokalisert til cytoplasma og at det er en interaksjon mellom NGFI-B og BAX. Dette er imidlertid ikke en signifikant forskjell. Det ser også ut til at det er en tendens til interaksjon i konsentrasjonsgradientforsøket med NGFI-B-gfp og NGFI-B-wt, der man ser en doseavhengig reduksjon i luciferasetallene (Figur 3.14 og Figur 3.15).

Ko-immunpresipiteringsforsøket med BAX og NGFI-B (Figur 3.22) kan tyde på at det har blitt presipitert ned både NGFI-B og BAX i begge cellelysatsene, selv om BAX båndet i cellelysat 2 er svakt og mulig degradert. Dette må selvfølgelig gjentas flere ganger, men sammen med luciferaseforsøkene kan dette indikere at BAX påvirker lokalisasjonen til NGFI-B.

Dette kan bety at det er en direkte interaksjon mellom BAX og NGFI-B. Hvordan en eventuell dimerisering mellom NGFI-B og BAX ville påvirke apoptosemekanismen må studeres. Man kan tenke seg at en dimerisering med BAX ville kunne endre konfigurasjonen, slik NGFI-B gjør med BCL-2. Et annet alternativ er at NGFI-B kan være involvert i oligomeriseringen av BAX monomere i mitokondrieytermembranen. Man kan også tenke seg at BAX fremmer interaksjonen mellom NGFI-B og andre BCL-2-familiemedlemmer (f.eks BCL-2) slik at BH3-only proteiner (f.eks BIM) frigjøres og at man videre får aktivert BAX/BAK og indusert apoptose.

4.2.4 BCL-X_L

BCL-X_L interagerer ikke med NGFI-B (Luciano et al. 2007). BCL-X_L vil derfor fungere som en negativ kontroll for metoden. Ved å repetere funnet som tidligere har blitt gjort, vil dette forsterke antagelsene om at luciferasemetoden kan brukes til å studere interaksjoner mellom NGFI-B og BCL-2 proteinene.

Figur 3.12 viser at BCL-X_L har høyere FL/RL tall enn CMV kontrollen. Dette kunne tyde på at BCL-X_L bidro til en kjerneimport av NGFI-B, men ut fra FL kontrollen

(Figur 3.10 C) viste denne at BCL-X_L påvirket FL produksjonen. BCL-X_L verdien vil derfor kunne være falsk for høy.

En mulighet for å unngå dette vil være å finne et luciferase-reportergen som ikke påvirkes av BCL-X_L.

I Figur 3.14 er det transfektert med gfp merket NGFI-B. Her ser det ut til at det kan være en interaksjon mellom BCL-X_L og NGFI-B noe som ikke stemmer med tidligere studier. I Figur 3.15 er det transfektert med NGFI-B uten gfp merking og her er denne tendensen ikke tilstede. Dette indikerer at man må være oppmerksom på at modifiserte proteiner ikke nødvendigvis har de samme egenskapene som villtype proteiner.

Ko-immunpresipitering av BCL-X_L og NGFI-B (Figur 3.23) viser at man har fått ned NGFI-B bånd i begge cellelysats og i tillegg ser det ut til at det også er BCL-X_L bånd i begge lysatene. Ved ingen interaksjon mellom NGFI-B og BCL-X_L, burde det kun ha blitt detektert NGFI-B bånd i cellelysats 2 og BCL-X_L bånd i cellelysats 1. Dette forsøket må som nevnt tidligere repeteres med flere passende kontroller.

4.2.5 BAD

Figur 3.12 viser at BAD ser ut til å ha den sterkeste interaksjonen med NGFI-B i forhold til CMV kontrollen og denne forskjellen er også signifikant. Denne tendensen bekreftes i Figur 3.14 og Figur 3.15 der luciferasetallene viser en doseavhengig reduksjon, noe som indikerer økt cytosollokalisasjon av NGFI-B.

BAD er et proapoptotisk protein som i inaktiv tilstand vil være bundet til 14-3-3 proteiner (Datta et al. 1997). I aktiv tilstand dimeriserer BAD med de antiapoptotiske proteinene (spesielt BCL-X_L) ved mitokondriemembranen, slik at BAX og BAK kan aktiveres. BAD kan ikke indusere apoptose uten at BAX/BAK er til stede i cellen (Zong et al. 2001). Når NGFI-B dimeriserer med BCL-2 får man en økning i apoptosedød (Lin et al. 2004). Det er nærliggende å anta at en dimerisering med BAD vil hindre BAD i å interagere med f.eks BCL-X_L, som videre vil føre til en reduksjon i apoptose.

Alternativt kan man tenke seg at BAD i utgangspunktet er dimerisert med BCL-2 men at dette komplekset kan interagere med NGFI-B og indusere apoptose.

Hvis en ko-immunpresipitering bekrefter at det foreligger en interaksjon mellom NGFI-B og BAD hadde det vært interessant å analysere om dette BAD proteinet var

den fosforylerte varianten, eller om det er den aktiverte ufosforylerte varianten ved å benytte proteomikk.

4.2.6 NGFI-B mutanter

Figur 3.16 viser ulike konsentrasjoner av BCL-2 sammen med NGFI-B mutanten BT-gfp (T₁₄₂A). Dette fosforyleringssetet har blitt identifisert som sete for ERK2 (Slagsvold et al. 2002). BT-gfp har en tydelig og signifikant doseavhengig reduksjon i luciferasetallene, mens kontrollen (BCL-2 + NGFI-B-gfp) overraskende nok, ikke har det. Sammenlignet med kontrollen ser det ut til at BT-gfp har en sterkere interaksjon med BCL-2. Det betyr at NGFI-B med ufosforylert T₁₄₂ har en sterkere interaksjon med BCL-2 enn med antatt fosforylert NGFI-B. For å stadfeste dette kan man tenke seg å benytte en mutant som har glutamat i T₁₄₂ setet og som ofte ligner en fosforylert variant (BTE-gfp). Hvis BT-gfp har en sterkere interaksjon med BCL-2 enn det BTE-gfp har, kan dette bety at NGFI-B med ufosforylert T₁₄₂ fasiliserer binding med BCL-2.

Tidligere studier har vist at ERK2 hemmer apoptose og fremmer kjernelokalisering av NGFI-B (Jacobs et al. 2004; Jacobs and Paulsen 2005). Siden BCL-2 interaksjonen med NGFI-B fører til mitokondrielokalisering og apoptose (Lin et al. 2004) er dette forenelig med at et kjerneimports signal (ERK2) vil kunne påvirke og redusere interaksjonen mellom BCL-2 og NGFI-B.

Tidligere i resultatene er det vist en doseavhengig reduksjon i luciferasetallene ved transfeksjon med BCL-2 og NGFI-B-gfp (Figur 3.14). Siden den samme tendensen ikke er sett i Figur 3.16 og fordi forsøket har få paralleller må det gjentas. Det er også viktig å gjøre samme forsøk med NGFI-B uten gfp merking.

Figur 3.17 viser konsentrasjonsgraderte forsøk med BCL-2 og CBS (S₁₃₉A), CBT (T₁₄₂A) og NGFI-B-wt. Det ser ikke ut til at det er noen doseavhengig nedgang i luciferasetallene for CBS og NGFI-B-wt, noe som kan bety at det ikke foreligger noen interaksjon mellom BCL-2 og CBS eller NGFI-B. For CBT kan det se ut som at det er en svak tendens til nedgang og det kan derfor være mulig at det er en svak interaksjon mellom CBT og BCL-2. Dette stemmer med resultatene i forrige avsnitt, der BT-gfp ga en interaksjon med BCL-2 som var sterkere enn kontrollen. Det ser altså ut til at

NGFI-B med ufosforylert T₁₄₂ interagerer sterkere med BCL-2 enn det NGFI-B-wt gjør.

NGFI-B-wt har en svak/ingen interaksjon og S₁₃₉ viser samme tendens. S₁₃₉ er involvert i kjerneeksporten av NGFI-B. NGFI-B med S₁₀₅A (S₁₃₉A med første methionin som startaminosyre) ga ingen kjerneeksport av NGFI-B når man behandlet med NGF (Katagiri et al. 2000). Dette kan forklare at CBS har en svak interaksjon med BCL-2 fordi CBS i større grad vil være lokalisert til kjernen. Alternativt kan det være at CBS ikke gir noen interaksjon med BCL-2 og at man av den grunn ikke får noen reduksjon i luciferasetallene. En glutamat mutant (CBSE), kan vise om fosforylert S₁₃₉ vil interagere med BCL-2 og gi reduksjon i luciferasetallene. Det er mulig at dette setet er ufosforylert i NGFI-B-wt og at det er derfor luciferasetallene ligner tallene for CBS.

Figur 3.18 viser at kontrollen (BCL-2 + Nur77-wt) har en doseavhengig reduksjon i luciferasetall og at dette indikerer en interaksjon mellom NGFI-B og BCL-2. Nur350A mutanten og BCL-2 viser ikke samme reduksjon og det ser derfor ut til at en interaksjon mellom disse er mye svakere enn for kontrollen. Fosforylering av Ser₃₅₀ av NGF reduserer bindingen av NGFI-B til DNA og dermed reduseres også transkripsjonsaktiviteten (Hirata et al. 1993; Katagiri et al. 2000). Fosforyleringen av Ser₃₅₀ fremmer interaksjonen mellom NGFI-B og BCL-2 i forhold til ufosforylert Ser₃₅₀. Dette henger sammen ved at man kan tenke seg at NGFI-B med ufosforylert Ser₃₅₀ vil være bundet til DNA og derfor være lokalisert i kjernen, mens NGFI-B med fosforylert Ser₃₅₀ vil ha mindre binding til DNA og derfor lettere vil kunne translokaliseres til cytosol og videre interagere med BCL-2. Det er vist at Akt fosforylert Ser₃₅₀ NGFI-B, får redusert transkripsjonell aktivitet med 50-85 % (Pekarsky et al. 2001). Det hadde derfor vært nærliggende å forvente at Nur350A hadde ligget høyere i luciferasetall enn Nur77-wt. Dette ser ikke ut til å være noen trend. Det er likevel ikke sikkert at den varianten av NGFI-B som er tilstede i cella når det transfekteres med Nur77-wt er den fosforylerte varianten. Da må forskjellen i luciferasetallene med BCL-2 tilstede ha en annen forklaring. En mulighet er at sekvensen deltar direkte i protein-protein kompleksdannelsen og at serin og alanin påvirker denne. Det er derfor nødvendig å mimikere en fosforylert Ser₃₅₀ NGFI-B ved å bruke en glutamat mutant, for å se om denne vil gi samme doseavhengige respons og kanskje lavere luciferasetall enn Nur350A. Alternativt kan Nur350A være uttrykt i

et lavere nivå enn det Nur-77-wt er. For å se om dette er tilfellet, kan Westernblotting brukes for deretter å analysere intensiteten av proteinbåndene.

Alle forsøkene med mutanter av NGFI-B bør gjentas, da både NGFI-B-gfp og NGFI-B-wt ikke så ut til å gi redusert luciferaseaktivitet med BCL-2. Antall paralleller er også for lavt til å kunne vurdere resultatene med sikkerhet.

5 Konklusjon

- 1) Det ble etablert et luciferasemetode oppsett som kan brukes til å studere interaksjoner mellom BCL-2-familieproteiner og NGFI-B i cellekultur.
- 2) BAX og BAD ser ut til å interagere med NGFI-B.
- 3) NGFI-B med Thr-142 erstattet med alanin ser ut til å gi en sterkere interaksjon med BCL-2 enn NGFI-B-wt.
NGFI-B med Ser-139 erstattet med alanin ser ikke ut til å påvirke interaksjonen med BCL-2.
NGFI-B med Ser-350 erstattet med alanin ser ut til å gi en svakere/ingen interaksjon med BCL-2 sammenlignet med NGFI-B-wt.
- 4) Det ble etablert en ko-immunpresipiteringsmetoden for å kunne studere interaksjoner mellom BCL-2-familieproteinene og NGFI-B *in-vitro*.

6 Referanser

- Antonsson, B. 2001. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell and Tissue Research* 306(3):347-361.
- Antonsson, B., F. Conti, A. Ciavatta, S. Montessuit, S. Lewis, I. Martinou, L. Bernasconi, A. Bernard, J. J. Mermod, G. Mazzei, K. Maundrell, F. Gambale, R. Sadoul and J. C. Martinou. 1997. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277(5324):370-372.
- Antonsson, B., S. Montessuit, S. Lauper, R. Eskes and J. C. Martinou. 2000. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochemical Journal* 345 Pt 2:271-278.
- Antonsson, B., S. Montessuit, B. Sanchez and J. C. Martinou. 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *Journal of Biological Chemistry* 276(15):11615-11623.
- Apte, S. S., M. G. Mattei and B. R. Olsen. 1995. Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* 26(3):592-594.
- Basanez, G., A. Nechushtan, O. Drozhinin, A. Chanturiya, E. Choe, S. Tutt, K. A. Wood, Y. Hsu, J. Zimmerberg and R. J. Youle. 1999. Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 96(10):5492-5497.
- Beilharz, T., B. Egan, P. A. Silver, K. Hofmann and T. Lithgow. 2003. Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 278(10):8219-8223.
- Berggard, T., S. Linse and P. James. 2007. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 7(16):2833-2842.
- Blank, M. and Y. Shiloh. 2007. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* 6(6):686-695.
- Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, C. E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L. A. Turka, X. Mao, G. Nunez and C. B. Thompson. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74(4):597-608.
- Brady, H. J. and G. Gil-Gomez. 1998. Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 30(6):647-650.
- Brenner, C. and G. Kroemer. 2000. Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science* 289(5482):1150-1151.
- Cao, X., W. Liu, F. Lin, H. Li, S. K. Kolluri, B. Lin, Y. H. Han, M. I. Dawson and X. K. Zhang. 2004. Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis

[corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Molecular Cell Biology* 24(22):9705-9725.

Cartron, P. F., T. Gallenne, G. Bougras, F. Gautier, F. Manero, P. Vusio, K. Meflah, F. M. Vallette and P. Juin. 2004. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Molecular Cell* 16(5):807-818.

Certo, M., V. Del Gaizo Moore, M. Nishino, G. Wei, S. Korsmeyer, S. A. Armstrong and A. Letai. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9(5):351-365.

Chang, C., J. Kokontis, S. S. Liao and Y. Chang. 1989. Isolation and characterization of human TR3 receptor: a member of steroid receptor superfamily. *Journal of Steroid Biochemistry* 34(1-6):391-395.

Chen, J., S. H. Graham, P. H. Chan, J. Lan, R. L. Zhou and R. P. Simon. 1995. bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. *Neuroreport* 6(2):394-398.

Chen, J., R. P. Simon, T. Nagayama, R. Zhu, J. E. Loeffert, S. C. Watkins and S. H. Graham. 2000. Suppression of endogenous bcl-2 expression by antisense treatment exacerbates ischemic neuronal death. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20(7):1033-1039.

Chen, L., S. N. Willis, A. Wei, B. J. Smith, J. I. Fletcher, M. G. Hinds, P. M. Colman, C. L. Day, J. M. Adams and D. C. Huang. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell* 17(3):393-403.

Cheng, E. H., B. Levine, L. H. Boise, C. B. Thompson and J. M. Hardwick. 1996. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 379(6565):554-556.

Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten and S. J. Korsmeyer. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell* 8(3):705-711.

Chittenden, T., C. Flemington, A. B. Houghton, R. G. Ebb, G. J. Gallo, B. Elangovan, G. Chinnadurai and R. J. Lutz. 1995. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *The Embo Journal* 14(22):5589-5596.

Cory, S. and J. M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2(9):647-656.

Darzynkiewicz, Z., X. Li and J. Gong. 1994. Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods in Cell Biology* 41:15-38.

- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh and M. E. Greenberg. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2):231-241.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, A. Nichols, R. Eskes, S. Montessuit, S. Lauper, K. Maundrell, B. Antonsson and J. C. Martinou. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 144(5):891-901.
- Dittmer, A. and J. Dittmer. 2006. Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 27(14):2844-2845.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35(4):495-516.
- Enmark, E. and J. A. Gustafsson. 1996. Orphan nuclear receptors--the first eight years. *Molecular Endocrinology* 10(11):1293-1307.
- Fahrner, T. J., S. L. Carroll and J. Milbrandt. 1990. The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. *Molecular and Cellular Biology* 10(12):6454-6459.
- Forman, B. M., K. Umesono, J. Chen and R. M. Evans. 1995. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* 81(4):541-550.
- Goping, I. S., A. Gross, J. N. Lavoie, M. Nguyen, R. Jemmerson, K. Roth, S. J. Korsmeyer and G. C. Shore. 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *Journal of Cell Biology* 143(1):207-215.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52(2):456-467.
- Hacker, G. and A. Weber. 2007. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462(2):150-155.
- Han, Y. H., X. Cao, B. Lin, F. Lin, S. K. Kolluri, J. Stebbins, J. C. Reed, M. I. Dawson and X. K. Zhang. 2006. Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt. *Oncogene* 25(21):2974-2986.
- Hayes, P. C., C. R. Wolf and J. D. Hayes. 1989. Blotting techniques for the study of DNA, RNA, and proteins. *British Medicine Journal* 299(6705):965-968.
- Hazel, T. G., R. Misra, I. J. Davis, M. E. Greenberg and L. F. Lau. 1991. Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment. *Molecular and Cellular Biology* 11(6):3239-3246.
- Hazel, T. G., D. Nathans and L. F. Lau. 1988. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 85(22):8444-8448.

- Heyman, R. A., D. J. Mangelsdorf, J. A. Dyck, R. B. Stein, G. Eichele, R. M. Evans and C. Thaller. 1992. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68(2):397-406.
- Hirata, Y., K. Kiuchi, H. C. Chen, J. Milbrandt and G. Guroff. 1993. The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. *The Journal of Biological Chemistry* 268(33):24808-24812.
- Hirotsu, M., Y. Zhang, N. Fujita, M. Naito and T. Tsuruo. 1999. NH2-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 274(29):20415-20420.
- Hopps, H. E., B. C. Bernheim, A. Nisalak, J. H. Tjio and J. E. Smadel. 1963. Biologic Characteristics of a Continuous Kidney Cell Line Derived from the African Green Monkey. *Journal of Immunology* 91:416-424.
- Hori, K. and M. J. Cormier. 1966. Studies on the bioluminescence of *Renilla reniformis*. VI. Some chemical properties and the tentative partial structure of luciferin. *Biochim Biophys Acta* 130(2):420-425.
- Hsu, Y. T., K. G. Wolter and R. J. Youle. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 94(8):3668-3672.
- Hsu, Y. T. and R. J. Youle. 1998. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *Journal of Biological Chemistry* 273(17):10777-10783.
- Hunter, J. J. and T. G. Parslow. 1996. A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 271(15):8521-8524.
- Ito, T., X. Deng, B. Carr and W. S. May. 1997. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *Journal of Biological Chemistry* 272(18):11671-11673.
- Jacobs, C. M., K. A. Boldingh, H. H. Slagsvold, G. H. Thoresen and R. E. Paulsen. 2004. ERK2 prohibits apoptosis-induced subcellular translocation of orphan nuclear receptor NGFI-B/TR3. *Journal of Biological Chemistry* 279(48):50097-50101.
- Jacobs, C. M. and R. E. Paulsen. 2005. Crosstalk between ERK2 and RXR regulates nuclear import of transcription factor NGFI-B. *Biochemical Biophysical Research Communication* 336(2):646-652.
- Jacobs, C. M., M. D. Trinh, T. Rootwelt, J. Lomo and R. E. Paulsen. 2006. Dexamethasone induces cell death which may be blocked by NMDA receptor antagonists but is insensitive to Mg²⁺ in cerebellar granule neurons. *Brain Research* 1070(1):116-123.

- Katagiri, Y., Y. Hirata, J. Milbrandt and G. Guroff. 1997. Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* 272(50):31278-31284.
- Katagiri, Y., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Ozato and G. Guroff. 2000. Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat Cell Biol* 2(7):435-440.
- Kaufmann, T., S. Schlipf, J. Sanz, K. Neubert, R. Stein and C. Borner. 2003. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *The Journal of Cell Biology* 160(1):53-64.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4):239-257.
- Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, H. C. Tu, J. R. Jeffers, G. P. Zambetti, J. J. Hsieh and E. H. Cheng. 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8(12):1348-1358.
- Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, J. E. Chipuk, C. Bonzon, B. A. Sullivan, D. R. Green and D. D. Newmeyer. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell* 17(4):525-535.
- Lee, J. 2001. Bioluminescence. In *Encyclopedia of lifesciences*: John Wiley & Sons.
- Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler and S. J. Korsmeyer. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2(3):183-192.
- Li, H., S. K. Kolluri, J. Gu, M. I. Dawson, X. Cao, P. D. Hobbs, B. Lin, G. Chen, J. Lu, F. Lin, Z. Xie, J. A. Fontana, J. C. Reed and X. Zhang. 2000. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 289(5482):1159-1164.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4):479-489.
- Li, Y., B. Lin, A. Agadir, R. Liu, M. I. Dawson, J. C. Reed, J. A. Fontana, F. Bost, P. D. Hobbs, Y. Zheng, G. Q. Chen, B. Shroot, D. Mercola and X. K. Zhang. 1998. Molecular determinants of AHPN (CD437)-induced growth arrest and apoptosis in human lung cancer cell lines. *Molecular Cell Biology* 18(8):4719-4731.
- Lin, B., S. K. Kolluri, F. Lin, W. Liu, Y. H. Han, X. Cao, M. I. Dawson, J. C. Reed and X. K. Zhang. 2004. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116(4):527-540.

- Lindsten, T., W. X. Zong and C. B. Thompson. 2005. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. *Neuroscientist* 11(1):10-15.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1):147-157.
- Lopper, M.J and J.L Keck. 2007. Protein-protein interactions: Identification. In *Encyklopedia of life sciences*: John Wiley & Sons.
- Luciano, F., M. Krajewska, P. Ortiz-Rubio, S. Krajewski, D. Zhai, B. Faustin, J. M. Bruey, B. Bailly-Maitre, A. Lichtenstein, S. K. Kolluri, A. C. Satterthwait, X. K. Zhang and J. C. Reed. 2007. Nur77 converts phenotype of Bcl-B, an antiapoptotic protein expressed in plasma cells and myeloma. *Blood* 109(9):3849-3855.
- Maira, M., C. Martens, A. Philips and J. Drouin. 1999. Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Molecular and Cellular Biology* 19(11):7549-7557.
- Manakova, S., K. A. Puttonen, A. Raasmaja and P. T. Mannisto. 2003. Ara-C induces apoptosis in monkey fibroblast cells. *Toxicology In Vitro* 17(3):367-373.
- Manakova, S., K. A. Puttonen, A. Raasmaja and P. T. Mannisto. 2004. The roles of dopamine transporter and Bcl-2 protein in the protection of CV1-P cells from 6-OHDA-induced toxicity. *Toxicological Letter* 154(1-2):117-123.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon and R. M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83(6):835-839.
- Matuszyk, J., E. Ziolo, M. Cebrat, I. Kochel and L. Strzadala. 2002. Nurrl affects pRL-TK but not phRG-B internal control plasmid in genetic reporter system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294(5):1036-1039.
- Merry, D. E. and S. J. Korsmeyer. 1997. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annual Review of Neuroscience* 20:245-267.
- Milbrandt, J. 1988. Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1(3):183-188.
- Minn, A. J., P. Velez, S. L. Schendel, H. Liang, S. W. Muchmore, S. W. Fesik, M. Fill and C. B. Thompson. 1997. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385(6614):353-357.
- Misteli, T. and D. L. Spector. 1997. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotechnology* 15(10):961-964.
- Moll, U. M., N. Marchenko and X. K. Zhang. 2006. p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* 25(34):4725-4743.

- Muchmore, S. W., M. Sattler, H. Liang, R. P. Meadows, J. E. Harlan, H. S. Yoon, D. Nettlesheim, B. S. Chang, C. B. Thompson, S. L. Wong, S. L. Ng and S. W. Fesik. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381(6580):335-341.
- Narita, M., S. Shimizu, T. Ito, T. Chittenden, R. J. Lutz, H. Matsuda and Y. Tsujimoto. 1998. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 95(25):14681-14686.
- Nechushtan, A., C. L. Smith, Y. T. Hsu and R. J. Youle. 1999. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *The Embo Journal* 18(9):2330-2341.
- Nguyen, M., D. G. Millar, V. W. Yong, S. J. Korsmeyer and G. C. Shore. 1993. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *Journal of Biological Chemistry* 268(34):25265-25268.
- O'Connor, L., A. Strasser, L. A. O'Reilly, G. Hausmann, J. M. Adams, S. Cory and D. C. Huang. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The Embo Journal* 17(2):384-395.
- Oltvai, Z. N., C. L. Millman and S. J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4):609-619.
- Pegoraro, L., A. Palumbo, J. Erikson, M. Falda, B. Giovanazzo, B. S. Emanuel, G. Rovera, P. C. Nowell and C. M. Croce. 1984. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 81(22):7166-7170.
- Pekarsky, Y., C. Hallas, A. Palamarchuk, A. Koval, F. Bullrich, Y. Hirata, R. Bichi, J. Letofsky and C. M. Croce. 2001. Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 98(7):3690-3694.
- Perlmann, T. and L. Jansson. 1995. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev* 9(7):769-782.
- Petros, A. M., A. Medek, D. G. Nettlesheim, D. H. Kim, H. S. Yoon, K. Swift, E. D. Matayoshi, T. Oltersdorf and S. W. Fesik. 2001. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 98(6):3012-3017.
- Petty, H. R. 2007. Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microscopy Research and Technique* 70(8):687-709.

- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast and M. J. Cormier. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2):229-233.
- Putcha, G. V., K. L. Moulder, J. P. Golden, P. Bouillet, J. A. Adams, A. Strasser and E. M. Johnson. 2001. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 29(3):615-628.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King and A. Strasser. 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular Cell* 3(3):287-296.
- Reed, J. C. 1996. A day in the life of the Bcl-2 protein: does the turnover rate of Bcl-2 serve as a biological clock for cellular lifespan regulation? *Leukemia Research* 20(2):109-111.
- Roset, R., L. Ortet and G. Gil-Gomez. 2007. Role of Bcl-2 family members on apoptosis: what we have learned from knock-out mice. *Frontiers in Bioscience* 12:4722-4730.
- Saito, M., S. J. Korsmeyer and P. H. Schlesinger. 2000. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2(8):553-555.
- Sattler, M., H. Liang, D. Nettlesheim, R. P. Meadows, J. E. Harlan, M. Eberstadt, H. S. Yoon, S. B. Shuker, B. S. Chang, A. J. Minn, C. B. Thompson and S. W. Fesik. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275(5302):983-986.
- Scatena, C. D., Z. A. Stewart, D. Mays, L. J. Tang, C. J. Keefer, S. D. Leach and J. A. Pietenpol. 1998. Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *Journal of Biological Chemistry* 273(46):30777-30784.
- Schinzl, A., T. Kaufmann and C. Borner. 2004. Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochimica et Biophysica Acta* 1644(2-3):95-105.
- Sedlak, T. W., Z. N. Oltvai, E. Yang, K. Wang, L. H. Boise, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer. 1995. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of USA* 92(17):7834-7838.
- Seliger, H. H., Elroy Wd Mc, E. H. White and G. F. Field. 1961. Stereo-specificity and firefly bioluminescence, a comparison of natural and synthetic luciferins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of USA* 47:1129-1134.
- Shimizu, S., M. Narita and Y. Tsujimoto. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399(6735):483-487.

- Slagsvold, H. H., A. C. Ostvold, A. B. Fallgren and R. E. Paulsen. 2002. Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291(5):1146-1150.
- Steinmetz, A. C., J. P. Renaud and D. Moras. 2001. Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structures* 30:329-359.
- Suzuki, M., R. J. Youle and N. Tjandra. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103(4):645-654.
- Thomas, A. L., C. Price, S. G. Martin, J. Carmichael and J. C. Murray. 1999. Identification of two novel mRNA splice variants of bax. *Cell Death and Differentiation* 6(2):97-98.
- Tong, T., J. Ji, S. Jin, X. Li, W. Fan, Y. Song, M. Wang, Z. Liu, M. Wu and Q. Zhan. 2005. Gadd45a expression induces Bim dissociation from the cytoskeleton and translocation to mitochondria. *Mol Cell Biol* 25(11):4488-4500.
- Travis, J. and W. D. McElroy. 1966. Isolation and sequence of an essential sulfhydryl peptide at the active site of firefly luciferase. *Biochemistry* 5(7):2170-2176.
- Tsujimoto, Y. and C. M. Croce. 1986. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 83(14):5214-5218.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu. 2000. Bcl-2 family: life-or-death switch. *Federation of European Biochemical Societies Letter* 466(1):6-10.
- Vaux, D. L., S. Cory and J. M. Adams. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335(6189):440-442.
- Wang, H. G., N. Pathan, I. M. Ethell, S. Krajewski, Y. Yamaguchi, F. Shibasaki, F. McKeon, T. Bobo, T. F. Franke and J. C. Reed. 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284(5412):339-343.
- Wang, Z., G. Benoit, J. Liu, S. Prasad, P. Aarnisalo, X. Liu, H. Xu, N. P. Walker and T. Perlmann. 2003. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423(6939):555-560.
- Watson, M. A. and J. Milbrandt. 1990. Expression of the nerve growth factor-regulated NGFI-A and NGFI-B genes in the developing rat. *Development* 110(1):173-183.
- Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292(5517):727-730.

- Whitfield, J., K. Harada, C. Bardelle and J. M. Staddon. 2003. High-throughput methods to detect dimerization of Bcl-2 family proteins. *Analytical Biochemistry* 322(2):170-178.
- Whitfield, J., S. J. Neame, L. Paquet, O. Bernard and J. Ham. 2001. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 29(3):629-643.
- Willis, S. N., L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J. I. Fletcher, J. M. Adams and D. C. Huang. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes and Development* 19(11):1294-1305.
- Willis, S. N., J. I. Fletcher, T. Kaufmann, M. F. van Delft, L. Chen, P. E. Czabotar, H. Ierino, E. F. Lee, W. D. Fairlie, P. Bouillet, A. Strasser, R. M. Kluck, J. M. Adams and D. C. Huang. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315(5813):856-859.
- Wilson, T. E., T. J. Fahrner, M. Johnston and J. Milbrandt. 1991. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252(5010):1296-1300.
- Wingate, A. D. and J. S. Arthur. 2006. Post-translational control of Nur77. *Biochemical Society Transactions* 34(Pt 6):1107-1109.
- Wingate, A. D., D. G. Campbell, M. Peggie and J. S. Arthur. 2006. Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation. *Biochemical Journal* 393(Pt 3):715-724.
- Won, J., D. Y. Kim, M. La, D. Kim, G. G. Meadows and C. O. Joe. 2003. Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278(21):19347-19351.
- Wu, M., H. Ding and D. Fisher. 2001. Apoptosis: Molecular mechanisms. In *Encyclopedia of lifesciences*: John Wiley & Sons.
- Wu, Q., Y. Li, R. Liu, A. Agadir, M. O. Lee, Y. Liu and X. Zhang. 1997. Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *The Embo Journal* 16(7):1656-1669.
- Yamamoto, K., H. Ichijo and S. J. Korsmeyer. 1999. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Molecular and Cellular Biology* 19(12):8469-8478.
- Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L. H. Boise, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80(2):285-291.

Yin, X. M., Z. N. Oltvai and S. J. Korsmeyer. 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369(6478):321-323.

Zetterstrom, R. H., L. Solomin, T. Mitsiadis, L. Olson and T. Perlmann. 1996. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Molecular Endocrinology* 10(12):1656-1666.

Zhou, M., S. D. Demo, T. N. McClure, R. Crea and C. M. Bitler. 1998. A novel splice variant of the cell death-promoting protein BAX. *Journal of Biological Chemistry* 273(19):11930-11936.

Zong, W. X., T. Lindsten, A. J. Ross, G. R. MacGregor and C. B. Thompson. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15(12):1481-1486.